

**BIOASSAY FÜR SCHILDDRÜSEN - STIMULIERENDE
ANTIKÖRPER :
METHODENENTWICKLUNG UND VERGLEICH
ZUM RADIOREZEPTORASSAY**

REINHARD MÜLLER

1986

*Das
München*

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK II DES KLINIKUMS GROSSHADERN
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
DIREKTOR: PROF. DR. G. PAUMGARTNER

BIOASSAY FÜR SCHILDDRÜSEN-STIMULIERENDE ANTIKÖRPER:
METHODENENTWICKLUNG UND VERGLEICH ZUM RADIOREZEPTORASSAY

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Reinhard Müller
aus
München
1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. K. Mann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. G. Paumgartner

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.02.86

INHALTSVERZEICHNIS

VORWORT	1
Meinen Eltern	
in Dankbarkeit	
1.1.1.1	1
1.1.1.2	2
1.1.1.3	3
1.1.1.4	4
1.1.1.5	5
1.1.1.6	6
1.1.1.7	7
1.1.1.8	8
1.1.1.9	9
1.1.1.10	10
1.1.1.11	11
1.1.1.12	12
1.1.1.13	13
1.1.1.14	14
1.1.1.15	15
1.1.1.16	16
1.1.1.17	17
1.1.1.18	18
1.1.1.19	19
1.1.1.20	20
1.1.1.21	21
1.1.1.22	22
1.1.1.23	23
1.1.1.24	24
1.1.1.25	25
1.1.1.26	26
1.1.1.27	27
1.1.1.28	28
1.1.1.29	29
1.1.1.30	30
1.1.1.31	31
1.1.1.32	32
1.1.1.33	33
1.1.1.34	34
1.1.1.35	35
1.1.1.36	36
1.1.1.37	37
1.1.1.38	38
1.1.1.39	39
1.1.1.40	40
1.1.1.41	41
1.1.1.42	42
1.1.1.43	43
1.1.1.44	44
1.1.1.45	45
1.1.1.46	46
1.1.1.47	47
1.1.1.48	48
1.1.1.49	49
1.1.1.50	50
1.1.1.51	51
1.1.1.52	52
1.1.1.53	53
1.1.1.54	54
1.1.1.55	55
1.1.1.56	56
1.1.1.57	57
1.1.1.58	58
1.1.1.59	59
1.1.1.60	60
1.1.1.61	61
1.1.1.62	62
1.1.1.63	63
1.1.1.64	64
1.1.1.65	65
1.1.1.66	66
1.1.1.67	67
1.1.1.68	68
1.1.1.69	69
1.1.1.70	70
1.1.1.71	71
1.1.1.72	72
1.1.1.73	73
1.1.1.74	74
1.1.1.75	75
1.1.1.76	76
1.1.1.77	77
1.1.1.78	78
1.1.1.79	79
1.1.1.80	80
1.1.1.81	81
1.1.1.82	82
1.1.1.83	83
1.1.1.84	84
1.1.1.85	85
1.1.1.86	86
1.1.1.87	87
1.1.1.88	88
1.1.1.89	89
1.1.1.90	90
1.1.1.91	91
1.1.1.92	92
1.1.1.93	93
1.1.1.94	94
1.1.1.95	95
1.1.1.96	96
1.1.1.97	97
1.1.1.98	98
1.1.1.99	99
1.1.1.100	100

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
2.	Methoden	3
2.1.	Bioassay	3
2.1.1.	Prinzip des Bioassays	3
2.1.2.	Durchführung	3
2.1.2.1.	Schilddrüsengewebepräparation	3
2.1.2.2.	Inkubation	4
2.1.2.3.	Diffusion	6
2.1.2.4.	T3-Bestimmung mittels Radioimmunoassay	6
2.1.3.	DNS-Bestimmung	8
2.1.4.	IgG-Isolierung an Protein A-Sepharose	8
2.1.5.	Säulenchromatographie des Serumüberstandes	9
2.1.6.	Auswertung des Bioassays	9
2.2.	Radiorezeptorassay	11
2.2.1.	Prinzip des Radiorezeptorassays	11
2.2.2.	Praktische Durchführung	11
2.2.3.	Standardisierung	12
2.2.4.	Auswertung	12
2.3.	Patientengut	13

3.	Ergebnisse	16
3.1.	Optimierung der Reaktionsbedingungen des Bioassays	16
3.1.1.	Präparations- und Inkubationszeiten	16
3.1.2.	Einfluß von Größe und Anzahl der Schilddrüsenquader	16
3.1.3.	Homogenität des Schilddrüsen Gewebes	22
3.1.4.	Standardisierung der Dialyse	23
3.1.5.	Einfluß der T3-Bindung und der T3-Serumkonzentration	26
3.1.6.	Optimierung des T3-Radioimmunoassays	30
3.1.6.1.	Sensitivität	30
3.1.6.2.	Qualitätskontrolle des RIA	32
3.1.7.	Qualitätskontrolle des Bioassay	36
3.2.	Einflußgrößen des Bioassay	38
3.2.1.	TSH	38
3.2.2.	Seren von Patienten mit M. Basedow	40
3.2.3.	Sensitivität und Spezifität der TSAb-Bestimmung	40
3.2.4.	Isoliertes IgG	43
3.2.5.	Unspezifische Faktoren	45
3.3.	Speziesspezifität	49
3.4.	Präzision des Radiorezeptorassays	52
3.5.	Einflußgrößen des Radiorezeptorassays	53
3.5.1.	TSH	53
3.5.2.	Seren von Patienten mit M. Basedow	56
3.5.3.	Sensitivität und Spezifität der TBII-Bestimmung	57
3.6.	Klinische Wertigkeit von TBII und TSAb	59

4.	Diskussion	64
4.1.	Nachweismethoden für Antikörper bei M. Basedow	64
4.2.	Methodische Probleme des Bioassays	69
4.3.	Speziesspezifität	81
4.4.	Methodische Probleme des Radio- rezeptorassays	82
4.5.	Klinische Wertigkeit	86
5.	Zusammenfassung	91
6.	Literaturverzeichnis	93
7.	Anhang	107
7.1.	Geräte	107
7.2.	Substanzen	107
7.3.	Lösungen	107
7.4.	Abkürzungen	109
7.5.	Danksagung	110
7.6.	Lebenslauf	111

1. Einleitung

C.A. Basedow beschrieb 1840 erstmals das Krankheitsbild einer Hyperthyreose mit Struma diffusa und Exophthalmus (6). 1956 konnte Adams im Serum dieser Patienten Substanzen nachweisen, die im Tierversuch Mäuseschilddrüsen stimulieren konnten (3). Noch im selben Jahr wurden diese schilddrüsenstimulierenden Faktoren als Immunglobuline identifiziert (52). Nach heutiger Auffassung kommen bei der Basedow-Hyperthyreose Autoantikörper vor, die gegen den TSH-Rezeptor gerichtet sind (58,65,85) und zu einer funktionellen Stimulation der Schilddrüse führen (64).

Für den Nachweis dieser Autoantikörper wurden zahlreiche Methoden vorgeschlagen, die auf der Bindung an TSH-Rezeptoren der Schilddrüsenmembran (84), der Aktivierung der Adenylatzyklase (63) oder Kolloidendozytose (51) bzw. der in vivo Freisetzung von Schilddrüsenhormonen (62) beruhen. Für diese Bestimmungsmethoden konnte allerdings keine Korrelation beim Vergleich untereinander gezeigt werden. Außerdem wurde keine Beziehung der Ergebnisse zur Aktivität der Erkrankung gefunden.

Ein neuer Ansatz wurde von Atkinson und Kendall-Taylor aufgezeigt, der die Messung der funktionellen Leistung der Autoantikörper in Form der in vitro Hormonfreisetzung ermöglicht. Erste Ergebnisse über die T₃-Freisetzung aus Schweineschilddrüsen wurden mitgeteilt (5).

Ziele der Arbeit waren:

- Aufbau eines Bioassays, der die T3-Freisetzung durch schilddrüsenstimulierende Immunglobuline aus menschlichem Gewebe in vitro bestimmt.
- Untersuchung der Spezifität der schilddrüsenstimulierenden Antikörper.
- Vergleich des Bioassays mit dem Radiorezeptorassay hinsichtlich der klinischen Wertigkeit.

2. Methoden

2.1. Bioassay

2.1.1. Prinzip des Bioassays

Prinzip der Methode nach Atkinson/Kendall-Taylor (5) ist die Bestimmung der T3-Freisetzung aus Schweineschilddrüsenschnitten in vitro durch Seren von Patienten mit M. Basedow.

2.1.2. Durchführung

2.1.2.1. Schilddrüsengewebepräparation

Schweineschilddrüsen wurden am örtlichen Schlachthof innerhalb von 30 Minuten post mortem aus den Halseingeweiden freipräpariert. Menschliches Schilddrüsengewebe erhielten wir intraoperativ von Patienten mit Struma diffusa. Das Gewebe wurde in eisgekühltem Puffer nach Earles zum Labor transportiert, grob von Fett- und Bindegewebe mit Pinzette und Skalpell gereinigt und mit einem Mikrotom in Scheiben mit einer Dicke von 0,5 mm geschnitten. Die Zerteilung in Quader mit einer Kantenlänge von 1 mm erfolgte mit Rasierklingen, die im Abstand von 1 mm in einen Aluminiumblock eingesetzt waren. Anschließend wurde das Gewebe bei 4°C unter vorsichtigem Schwenken für 30 Minuten in Earles-Puffer gewaschen.

2.1.2.2. Inkubation

Die Inkubation des Schilddrüsengewebes erfolgte in einem Zwei-Kompartiment-System (siehe Abb. 1). Nach Abschluß der oben beschriebenen Gewebepreparation wurden je 2 Schilddrüsenquader mit einer chirurgischen Mikropinzette auf die Dialysiermembran eines Teflontöpfchens, das mit 5 ml Earles-Puffer gefüllt war, übertragen und 100 µl dekomplementiertes Serum zugegeben. Die Inkubation erfolgte im auf 37°C vorgeheizten Wasserbad bei wasserdampfgesättigter Atmosphäre unter Einleitung von 1 l/min Carbogen (95 % O₂ / 5 % CO₂). Nach 5 Stunden wurde das Gewebe mit der Mikropinzette aus dem Töpfchen herausgenommen und mit 50 µl Earles-Puffer pro Quader nachgewaschen.

In jedem Ansatz wurde die T₃-Freisetzung aus dem Schilddrüsengewebe bei Zugabe der Negativkontrollen und von 1,0 U/l bTSH in 8-fach Bestimmungen getestet. Die bTSH-Konzentrationen 0,1 U/l und 1,0 U/l wurden in 4-fach Bestimmungen und die Positivkontrolle bzw. die Patientenserum in 5-fach Bestimmungen eingesetzt.

Zur Reduktion des Bakterienwachstums während der Inkubationszeit wurden die Töpfchen vor Versuchsbeginn nach üblicher Reinigung mit chemischen Zusätzen (Neo-disher®) 15 Stunden bei 180°C trockener Hitze im Wärmeschrank sterilisiert. Die Pufferlösung nach Earles wurde mit entmineralisiertem, keimfreien Wasser (Aqua ad injectabile) unter Zusatz von 0,1 g/l Cefotaxim (Claforan®) als Antibiotikum hergestellt und bei 4°C maximal eine Woche gelagert.

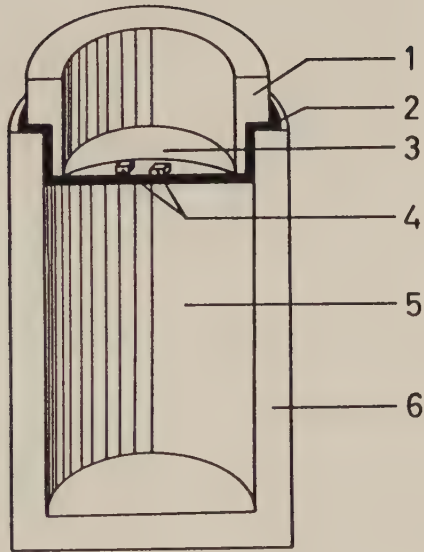


Abb. 1: Zweikompartmentssystem des Bioassays mit:

- 1 = Teflonring
- 2 = Dialysiermembran
- 3 = 100 μ l Serum
- 4 = Schilddrüsenquader (0,5 x 1 x 1 mm)
- 5 = 5 ml Earles-Puffer
- 6 = Teflongefäß

2.1.2.3. Diffusion

Die Diffusion des freien T3 (MG = 651) im Zwei-Kompartiment-System des Bioassays, das in Abb. 1 dargestellt ist, beruht auf dem Prinzip der Gleichgewichtsdialyse (32). Als Dialysiermembran verwendeten wir eine Cellulosemembran der Fa. Kalle (Nadir NG) mit einem maximalen Durchtrittsvermögen im Bereich von 10.000 - 15.000 MG und einer Ausschlußgrenze von etwa 50.000 MG. Sie wurde vor dem Einbringen zwischen Teflontöpfchen und -ring für je ca. 30 Minuten bei 20°C in Aqua bidest. und Earles-Lösung gewässert.

Die Dialyse des freien T3 wurde nach Entfernung des Schilddrüsengewebes über weitere 18 Stunden bei den unter 2.1.2.2. beschriebenen Bedingungen und zusätzlichem Schütteln der Töpfchen mit einer Frequenz von 100 1/min im Wasserbad fortgesetzt. Parallel dazu wurde zur Ermittlung des unspezifischen fT3-Gehalts jedes Serum in Abwesenheit von Schilddrüsengewebe in 3-fach Bestimmung mitgeführt. Nach Ablauf der Dialysierzeit wurde der Serumüberstand verworfen und die Membranen entfernt. Aus dem Unterstand wurde je ein Aliquot von 1 ml zur radioimmunologischen Bestimmung entnommen.

2.1.2.4. T3-Bestimmung mittels Radioimmunoassay

Das dialysierte freie T3 im Unterstand wurde mit einem Radioimmunoassay auf der Basis der Doppelantikörper-Methode (43) gemessen.

Trijodthyronin wurde in Earles-Puffer gelöst und als T3-Standard in Konzentrationen von 1 ng/l bis 3 ug/l eingesetzt. Antikörper I (lyophilisierter T3-Antikörper, Charge BE 81419, Fa. Henning, Berlin) und Antikörper II (Anti-Kaninchen-g-Globulin aus eigener Immunisierung einer jungen Ziege nach (59)) wurden in 1 %-igem RIA-Puffer (siehe Anhang) gelöst. Zur Stabilisierung der Antigen-/Antikörper-Komplexe wurde Kaninchenserum der Fa. Behring verwendet. Das von der Fa. Henning gelieferte 125J-T3 wurde mit 1 %-igem RIA-Puffer bis zu einer Aktivität von 400.000 cpm/ml verdünnt. Sämtliche Substanzen wurden bei -40°C gelagert.

Der T3-Radioimmunoassay wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

1. Tag: 200 ul Earles-Puffer und 100 ul T3-Standard
oder 300 ul Probe
50 ul Tracer mit stabilisierendem Kaninchenserum 1:150
100 ul T3-Antikörper 1:40.000.
20 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur.
2. Tag: 100 ul Anti-Kaninchen-g-Globulin
5 Stunden Inkubation bei 4°C
30 Minuten Zentrifugation bei 4°C mit 2.000 g
Dekantieren, Auswischen
g-Counter mit 60 Sekunden Zählzeit je Probe.

2.1.3. DNS-Bestimmung

Der DNS-Gehalt der Schilddrüsenquader wurde mit Hilfe der Diphenylamin-Methode, modifiziert nach Burton (19), bestimmt. Gewebe von 0,5 x 1,0 x 1,0 mm wurde mit 100 µl Aqua dest. versetzt und mit Ultraschall (20.000 Hz, 10 Watt, 10 sec.) homogenisiert. Das in der Probe enthaltene Protein wurde durch Erhitzen auf 95 °C für 30 Minuten in 2 %-iger Perchlorsäure denaturiert. Nach Zentrifugation bei 1.500 g für 2 Minuten wurde der Überstand abpipettiert und als Probe verwendet. Als DNS-Standard diente aus Kalbsthymus extrahierte DNS in 5 mM Natronlauge (Konzentration 0,33 mg/ml). Analog zu oben wurden eventuell vorhandene Proteinverunreinigungen entfernt. Zu je 400 µl der DNS-Standards (0,31 bis 166 µg/ml) und der Proben wurden 800 µl Diphenylamin-Reagenz (siehe Anhang) gegeben und bei Raumtemperatur 17 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Farbentwicklung im Photometer bei 600 nm gemessen.

2.1.4. IgG-Isolierung an Protein A-Sepharose

Die Isolierung des IgG erfolgte affinitätschromatographisch mit Protein A in Modifikation nach Hjelm (38): Das Patientenserum wurde mit Startpuffer (0,1M Phosphatpuffer, pH 7,0, siehe Anhang) 1:10 verdünnt und mit einer Geschwindigkeit von 10 ml/h auf eine Protein A-Sepharose CL 4B-Säule (1,0 x 7,0 cm) aufgetragen. Der Proteingehalt im Eluat wurde bei 280 nm im Photometer bestimmt. Die Säule wurde mit Startpuffer gewaschen (FluBrate 50 ml/h) bis keine UV-Absorption mehr nachweisbar war. Das gebundene IgG

wurde mit 1M Essigsäurelösung, pH 2,8, (siehe Anhang) unter Photometerkontrolle eluiert. Nach pH-Einstellung mit NaOH auf 7,0 wurden die IgG-haltigen Fraktionen in Kollodiumhülsen gegen Earles-Puffer dialysiert und auf 1 ml eingeeengt. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Folin-Phenol-Reagenz nach Lowry (56) mit IgG als Standard bestimmt und mit modifizierter Lösung nach Earles (Gelatine 5 g/l) auf eine Endkonzentration von 10 g/l verdünnt.

2.1.5. Säulenchromatographie des Serumüberstandes

Patientenserum, das nicht dekomplementiert wurde, wurde nach Zugabe von 125J-T3 (2.500.000 cpm/ml Serum) unter den in 2.1.2.3. beschriebenen Bedingungen dialysiert. Nach Beendigung der Diffusion wurde der Serumüberstand auf einer Biogel P 100-Säule (1,0 cm x 20 cm) chromatographiert. Die Eichung der Säule erfolgte mit Blue Dextran (V_0), 125J-HCG (MG = 48.000) und freiem 125-Jod. 400 μ l des Serumüberstandes wurden auf die Säule aufgetragen und bei einer Flußrate von 8 ml/h mit RIA-Puffer und 0,1 % BSA eluiert. In allen Fraktionen (Volumen je 1 ml) wurde der Gehalt an 125J im g-Counter und die Proteinkonzentration im UV-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen.

2.1.6. Auswertung des Bioassays

Das spezifisch durch die Schilddrüsenschnitten freigesetzte und dialysierte Δ fT3 errechnet sich aus der Differenz des gesamten fT3, das nach Gewebeinkubation radioimmunologisch gemessen werden kann, und dem frei dialysierbaren fT3 des

als Inkubationsmedium verwendeten Serums:

$$\Delta fT3 = fT3(\text{gesamt}) - fT3(\text{Serumdialyse})$$

Zur Berechnung der durch die Stimulation mit Basedow-Seren erzielten fT3-Freisetzung wird der unspezifische Anteil von fT3, der von den Schilddrüsenquadern bei Inkubation mit Normalserum (= Negativkontrolle) freigesetzt wird, subtrahiert. Um den Einfluß der unterschiedlichen Stimulierbarkeit der Schilddrüsen zu reduzieren, wird die TSAb-Aktivität der Patientenseren auf die Positivkontrolle, die in jedem Ansatz mitgeführt wird, bezogen. Die TSAb-Aktivität errechnete sich damit nach folgender Formel:

$$\text{TSAb-Aktivität} = \frac{\Delta fT3(\text{Pat.-serum}) - \Delta fT3(\text{Neg.-kontr.})}{\Delta fT3(\text{Pos.-kontr.}) - \Delta fT3(\text{Neg.-kontr.})} \times 100 \%$$

Alle Patientenseren, die außerhalb der doppelten Standardabweichung der Negativkontrolle lagen und deren TSAb-Aktivität >30 % war, wurden als TSAb-positiv eingestuft.

In obige Formeln wurden jeweils die Mittelwerte $\bar{x}$ eingesetzt, die sich aus den Einzelwerten nach folgender Gleichung ergeben:

$$\bar{x} = \sum x_i \cdot n^{-1}$$

Die Standardabweichung errechnet sich aus:

$$s = \left[\sum (x_i - \bar{x})^2 (n - 1)^{-1} \right]^{0,5}$$

2.2. Radiorezeptorassay

2.2.1. Prinzip des Radiorezeptorassays

Das Prinzip des Radiorezeptorassays beruht auf der Fähigkeit von TBII an den TSH-Rezeptor zu binden und damit exogen zugeführtes ^{125}J -TSH aus der Bindung zu verdrängen (84).

Das von uns verwendete System nach Shewring (83) zeichnet sich durch eine spezielle Präparation der TSH-Rezeptoren aus. Diese werden mit Lubrol 1,0 % aus grob gereinigten Schilddrüsenmembranen vom Schwein herausgelöst und anschließend mittels Ultrazentrifugation und Säulenchromatographie gereinigt.

2.2.2. Praktische Durchführung

Der Radiorezeptorassay wurde uns als kommerzieller Kit (TRAK-Assay) von der Fa. Henning, Berlin, zur Verfügung gestellt und entsprechend der Originalvorschrift des Herstellers durchgeführt:

Serumproben von je 50 μl wurden zusammen mit 100 μl TSH-Rezeptorlösung bei 20°C für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 100 μl ^{125}J -TSH zugegeben und die Inkubation über 60 Minuten bei 37°C im Wasserbad fortgesetzt. Nach Zugabe von 750 μl eisgekühltem TRIS-Puffer und 1 ml 30 %iger PEG-Lösung von 4°C wurden die Röhrchen bei 2000 g für 40 Minuten bei einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Nach Dekantieren und Auswischen der Röhrchen wurde der ^{125}J -TSH-Gehalt der Pellets im g-Counter bei einer Zählzeit von 5 Minuten bestimmt.

Das Normalserum wurde in jedem Ansatz als Vierfachbestimmung, alle Patientenserum, die Positivkontrolle sowie die TSH-Standards als Doppelbestimmung getestet.

2.2.3. Standardisierung

Die Standardisierung des Radiorezeptorassays erfolgte anhand von 33 Patienten mit gesichertem, aktivem M. Basedow vor thyreostatischer Therapie. Als Kontrollgruppe dienten 39 Patienten ohne Schilddrüsenerkrankungen. Mit Hilfe der Ergebnisse in diesen beiden Kollektiven wurde die Positivitätsgrenze festgelegt.

Zur Bestimmung der Spezifität des verwendeten Radiorezeptorassays wurden darüberhinaus Seren von Patienten mit Struma diffusa (n = 51), Autonomien (n = 64) und Z. n. Thyreoidektomie wegen Struma maligna (n = 67) herangezogen.

Die Standardisierung der TSH-Verdrängungskurve erfolgte mit bTSH-Verdünnungen in Serum mit den Konzentrationen 5 U/l, 15 U/l, 45 U/l, 135 U/l und 405 U/l.

2.2.4. Auswertung

Die Bindungsfähigkeit der Rezeptoren errechnet sich aus:

$$B = \frac{\text{gebundenes 125J-TSH}}{\text{zugesetztes 125J-TSH}} \times 100 \%$$

Die unspezifische Bindung wurde unter Verwendung von Lubrol-Lösung anstelle der Rezeptorsuspension bestimmt und mit folgendem Quotienten berechnet:

$$UB = \frac{\text{unspezifisch gebundenes } 125J\text{-TSH}}{\text{zugesetztes } 125J\text{-TSH}} \times 100 \%$$

Die TBII-Aktivität der Patientenserum wurde auf das Normalserum bezogen und als TBII-Index gemäß der folgenden Formel ausgedrückt:

$$TBII\text{-Index} = 1 - \frac{\text{spezifisch gebundenes } 125J\text{-TSH in Anwesenheit des Patientenserums}}{\text{spezifisch gebundenes } 125J\text{-TSH in Anwesenheit des Normalserums}} \times 100 \%$$

Patientenserum, deren TBII-Index größer als 15 % war, wurden als TBII-positiv eingestuft.

2.3. Patientengut

Die klinische Untersuchung wurde anhand von 58 Patienten mit M. Basedow, die sich vom August 1981 bis September 1982 in der endokrinologischen Ambulanz der Medizinischen Klinik II, Klinikum Großhadern, in Behandlung befanden, durchgeführt. Die Diagnose der Ersterkrankung bzw. des Rezidivs eines M. Basedow wurde gestützt auf klinische Beobachtungen (allgemeine Hyperthyreosezeichen, Exophthalmus) und Struma

diffusa im ^{99m}Tc -Szintigramm. Als klinisch-chemische Parameter, die von Prof. Dr. Vogt (a-c) bzw. Prof. Dr. Fateh (d,e) im Institut für Klinische Chemie, Klinikum Großhadern, durchgeführt wurden, fanden Berücksichtigung:

- a) T3 (RIA der Fa. Micro Medic; Normbereich 1,0 - 2,3 $\mu\text{g/l}$)
- b) T4 (EIA nach dem EMIT-Prinzip, Fa. Suva, Kalifornien; Normbereich 4,5 - 10,5 $\mu\text{g/dl}$)
- c) TRH-Test (Protirelin 0,2 mg i.v.; TSH-RIA, Fa. Henning, Berlin; Normbereich 30 Minuten: 2 - 25 mU/l)
- d) mikrosomale Antikörper (Thymune-M Hämagglutinationstest, Wellcome Reagents Ltd., England, Titer $>1:400$)
- e) Thyreoglobulin-Antikörper (Thymune-T Hämagglutinationstest, Wellcome Reagents Ltd., England, Titer $>1:160$).

Die Gesamtheit von 58 Patienten wurde in drei Gruppen unterteilt:

- Patienten vor Therapie (n = 23):
Patienten mit frischem, aktivem M. Basedow vor Beginn jeglicher Therapie.
- Patienten unter Therapie (n = 20):
Patienten, die thyreostatisch mit Methimazol 10 - 40 mg/d über einen Zeitraum von im Mittel 7 Monaten (4 - 18 Monate) behandelt wurden.
- Patienten in Remission (n = 15):
Remission wurde definiert als euthyreote Stoffwechsellage, mindestens 6 Monate nach Absetzen der Thyreostatika oder ablativer Therapie und ohne Anhalt für ein Rezidiv eines M. Basedows nach oben genannten Gesichtspunkten.

In Tab. 1 sind die klinischen bzw. laborchemischen Daten dieser Patientenkollektive zusammengefaßt.

	vor Therapie (n = 23)	unter Thyreostatika (n = 20)	in Remission (n = 15)
weibliche Patienten:			
n	16	14	11
Alter ($\bar{x} \pm s$)	45 $\pm$ 13 J.	49 $\pm$ 12 J.	47 $\pm$ 14 J.
männliche Patienten:			
n	7	6	4
Alter ($\bar{x} \pm s$)	51 $\pm$ 15 J.	50 $\pm$ 13 J.	50 $\pm$ 17 J.
Endokrine Ophthalmopathie (Stadium III-IV American Thyroid Association (101))	8 (34%)	8 (40%)	6 (40%)
Mikrosomale Antikörper (Titer >1:400)	16 (70%)	10 (50%)	3 (20%)
Thyreoglobulin-Antikörper (Titer >1:160)	8 (34%)	5 (25%)	0 (0%)
T3 (ug/l, $\bar{x} \pm s$)	3,8 $\pm$ 1,5	2,3 $\pm$ 0,9	1,7 $\pm$ 0,4
T4 (ug/dl, $\bar{x} \pm s$)	14,7 $\pm$ 5,4	9,0 $\pm$ 3,8	9,1 $\pm$ 2,7

Tab. 1: Charakterisierung der Patientenkollektive mit M. Basedow vor Therapiebeginn, unter thyreostatischer Therapie und in Remission.

3. Ergebnisse

3.1. Optimierung der Reaktionsbedingungen des Bioassays

3.1.1. Präparations- und Inkubationszeiten

Die basale T3-Freisetzung und die Stimulierbarkeit des Gewebes mit TSH wurde in Abhängigkeit der für die Präparation benötigten Zeit untersucht. Dabei zeigte sich eine deutliche Aktivitätsabnahme der Schilddrüsenquader bei Verlängerung des Schneidevorganges mit gleichzeitigem Anstieg der unspezifischen T3-Freisetzung (siehe Abb. 2). Dies weist auf die Notwendigkeit einer raschen Zerteilung der Schilddrüsen in Schnitten hin.

Die Zeitabhängigkeit der Schilddrüsenstimulation wurde im Bereich von 1 bis 8 Stunden überprüft. Dabei zeigte sich ein Anstieg der T3-Freisetzung mit einem Maximum nach 6 Stunden und einem leichten Rückgang der fT3-Konzentration im Unterstand bei Verlängerung der Inkubationszeit auf 8 Stunden (Abb. 3).

3.1.2. Einfluß von Größe und Anzahl der Schilddrüsenquader

Um die ideale Größe für die Gewebeschnitten zu ermitteln, wurden Schilddrüsenquader mit verschiedenen Kantenlängen inkubiert (siehe Tab. 2).

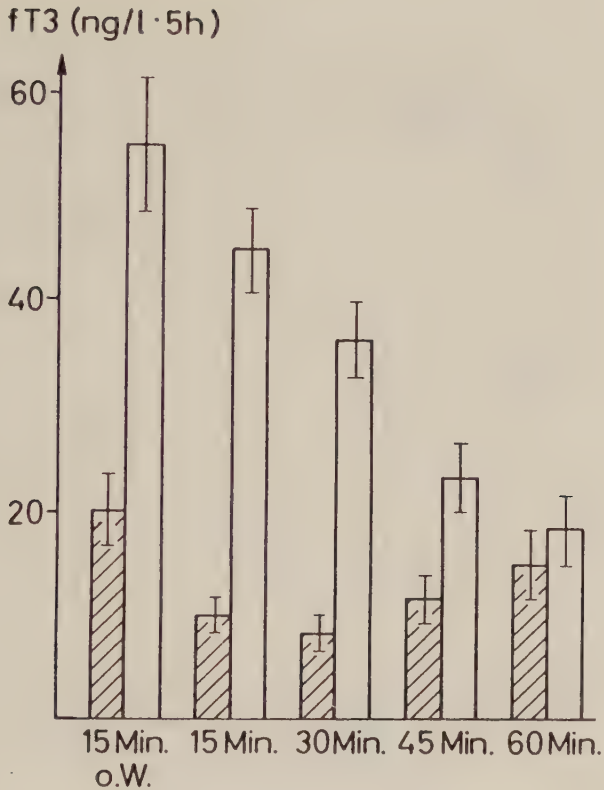


Abb. 2: Basale T3-Freisetzung und Stimulation von Schilddrüsenschnitten mit bTSH in Abhängigkeit der Verarbeitungszeit bei der Gewebepreparation ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n = 5$).
o.W.: ohne Waschen der Quader in Earles-Puffer bei 4°C
geschlossene Balken: basale T3-Freisetzung
offene Balken: Stimulation mit bTSH 1,0 U/l

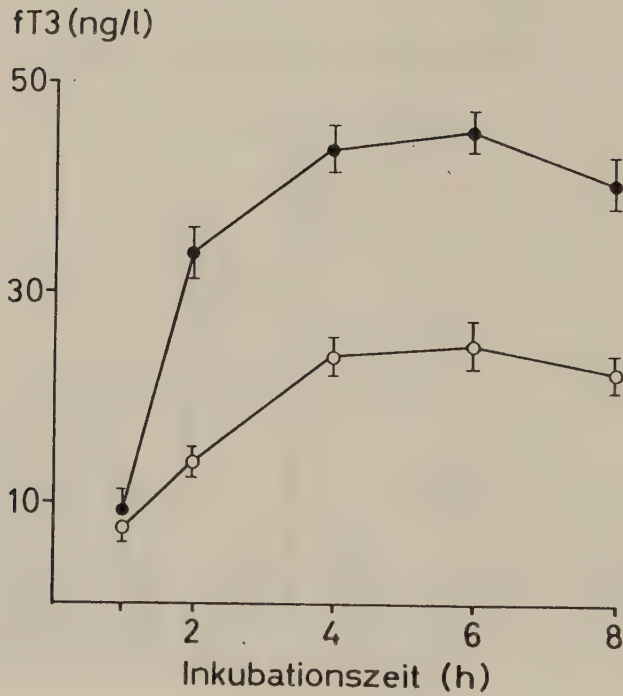


Abb. 3: T3-Freisetzung aus Schilddrüsengewebe in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei 37°C ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$).
○—○ menschliches Schilddrüsengewebe
●—● Schweineschilddrüsengewebe

Dabei zeigte sich eine Zunahme der T3-Freisetzung mit Vergrößerung der Gewebeoberfläche. Bei Schnitten mit 1,0 mm Dicke fand sich im Gegensatz zu Quadern mit 0,5 mm Höhe keine Stimulierbarkeit mit 1,0 U/l bTSH (siehe Tab. 2).

Quaderanzahl	2	4
Quadergröße	Quotient Basal/Stimuliert	
0,5 mm x 1,0 mm x 1,0 mm	2,5	1,9
0,5 mm x 2,0 mm x 2,0 mm	1,6	--
1,0 mm x 1,0 mm x 1,0 mm	1,1	1,0
1,0 mm x 2,0 mm x 2,0 mm	1,0	--

Tab. 2: Verhältnis der durch 1,0 U/l bTSH erzielten T3-Freisetzung und dem Basalwert in Abhängigkeit von Schilddrüsenquadergröße und -anzahl (n = 5).

Bei Verwendung von Schilddrüsenquadern von 0,5 mm x 1,0 mm x 1,0 mm Größe wurde der Einfluß der Quaderanzahl auf die T3-Freisetzung im Bereich von 2 bis 8 Schnitten pro Inkubationsgefäß untersucht. Dabei zeigte sich ein Anstieg des fT3 in den Töpfchen mit zunehmender Quaderanzahl. Die Basalproduktion stieg allerdings überproportional im Vergleich zur Stimulation mit bTSH (1,0 U/l), so daß sich der beste Stimulationsquotient TSH/Basal mit 2,5 bei 2 Schnitten pro Töpfchen fand (siehe Abb. 4).

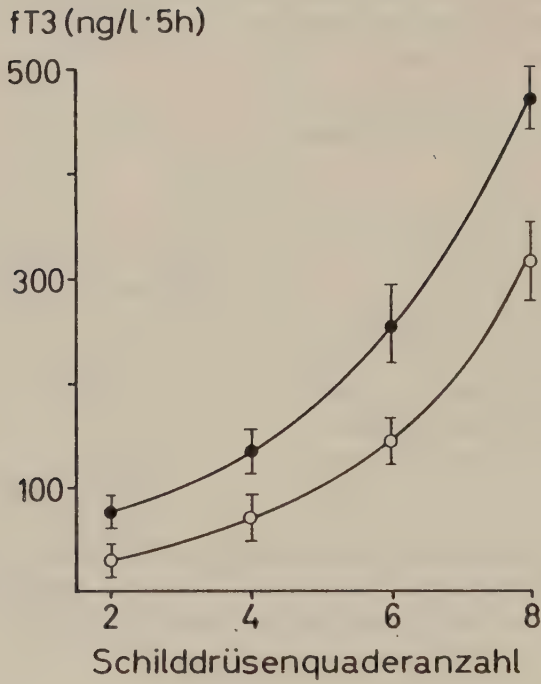


Abb. 4: Abhängigkeit der T3-Freisetzung von der Anzahl der inkubierten Schilddrüsenquader ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$).

○—○ gepooltes Normalserum
●—● 1,0 U/l bTSH in Normalserum

Die Reproduzierbarkeit der Schilddrüsenquader mit einer Größe von 0,5 mm x 1,0 mm x 1,0 mm wurde anhand des Feuchtgewichtes und des DNS-Gehalts untersucht.

Die Bestimmung des Feuchtgewichtes erfolgte bei 100 Schweineschilddrüsenquadern. Es fand sich ein mittleres Feuchtgewicht von $565 \mu\text{g} \pm 67 \mu\text{g}$ ($\bar{x} \pm s$), wobei nach dem Chi-Quadrat-Anpassungstest (89) eine Normalverteilung vorlag (siehe Abb. 5).

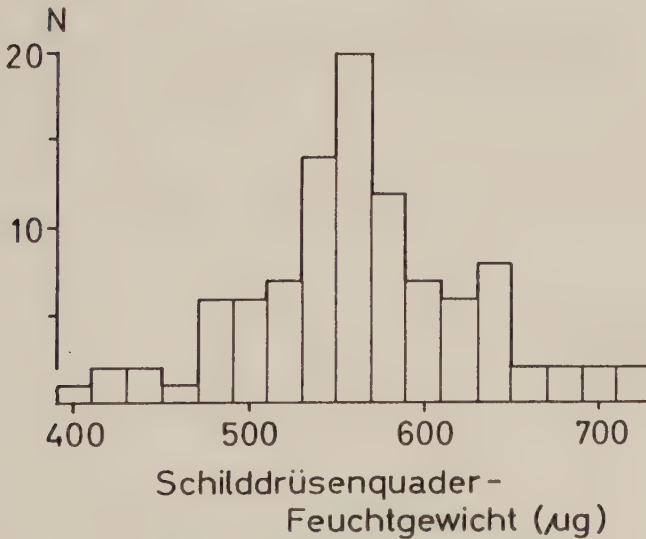


Abb. 5: Verteilung des Feuchtgewichts von 100 Schilddrüsenquadern der Größe 0,5 x 1,0 x 1,0 mm ($565 \mu\text{g} \pm 67 \mu\text{g}$, $\bar{x} \pm s$).

Bei der DNS-Bestimmung von 250 Schilddrüsenquadranten ergab sich ein Variationskoeffizient von 7,5 %. Die mittlere DNS-Konzentration betrug 1,70 ug/mg Feuchtgewicht bei Verwendung von Schweineschilddrüsen.

3.1.3. Homogenität des Schilddrüsengewebes

Um funktionelle Unterschiede innerhalb einer Schilddrüse zu erfassen, wurde die basale und mit 1,0 U/l bTSH stimulierte T3-Freisetzung an 9 verschiedenen Stellen beider Lappen einer Schweineschilddrüse untersucht. Das Ergebnis zeigte bei Überprüfung mit dem Wilcoxon-Test keine signifikanten Unterschiede (siehe Tab. 3). Vergleichbare Ergebnisse fanden sich auch in 2 Gebieten einer menschlichen Struma diffusa.

	Extremwerte	$\bar{x} \pm \text{SEM}$
Basalproduktion	22 - 31	26 ± 3
Stimulation	59 - 78	69 ± 8
TSH / Basal	1,8 - 2,9	$2,3 \pm 0,3$

Tab. 3: Basale und mit 1,0 U/l bTSH stimulierte T3-Freisetzung in ng/l an 9 verschiedenen Stellen einer Schweineschilddrüse.

3.1.4. Standardisierung der Dialyse

Der Einfluß der Temperatur, bei der die Wässerung der Cellulosemembran erfolgte, wurde im Bereich von 20°C bis 100°C untersucht. Es wurde das Durchtrittsvermögen für 125J-T3, das in Patientenserum gelöst wurde, bestimmt. Die 125J-T3-Diffusionsrate nahm bei Erhöhung der Inkubationstemperatur ab (siehe Abb. 6). Bei Temperaturen über 80°C erfolgte eine erneute Zunahme der Wiederfindungsrate des Tracers im Dialysat mit parallelem Anstieg der Proteinkonzentration, bestimmt im UV-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 280 nm.

Um die Zeitabhängigkeit des Diffusionsvorganges zu untersuchen, wurde gepooltem Patientenserum 125J-T3 zugesetzt und die 125J-T3-Recovery im Dialysat in Abhängigkeit der Diffusionszeit im g-Counter bestimmt. Dabei zeigte sich, daß nach 24 Stunden mit ca. 90 % der maximalen Recovery nach 48 Stunden ein ausreichendes Ergebnis erreicht wird (siehe Abb. 7).

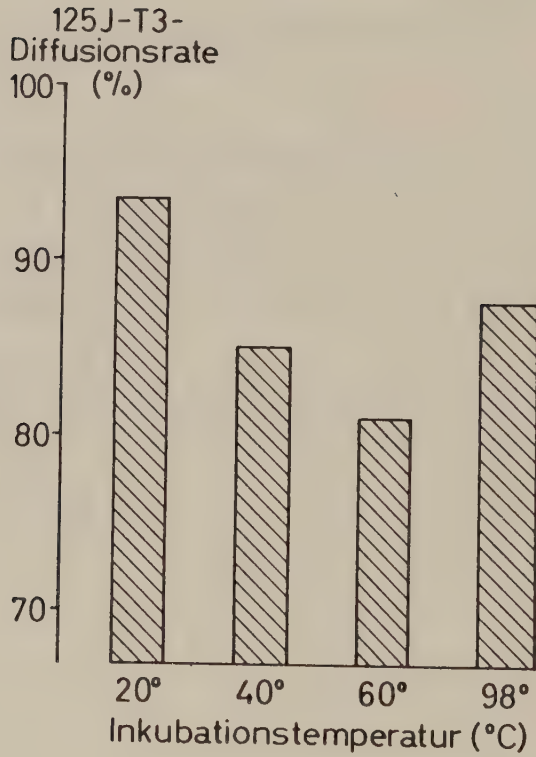


Abb. 6: Wiederfindungsrate von ^{125}J -T3 im Dialysat in Abhängigkeit der Temperatur, bei der die Vorbehandlung der Diffusionsmembranen erfolgte ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$).

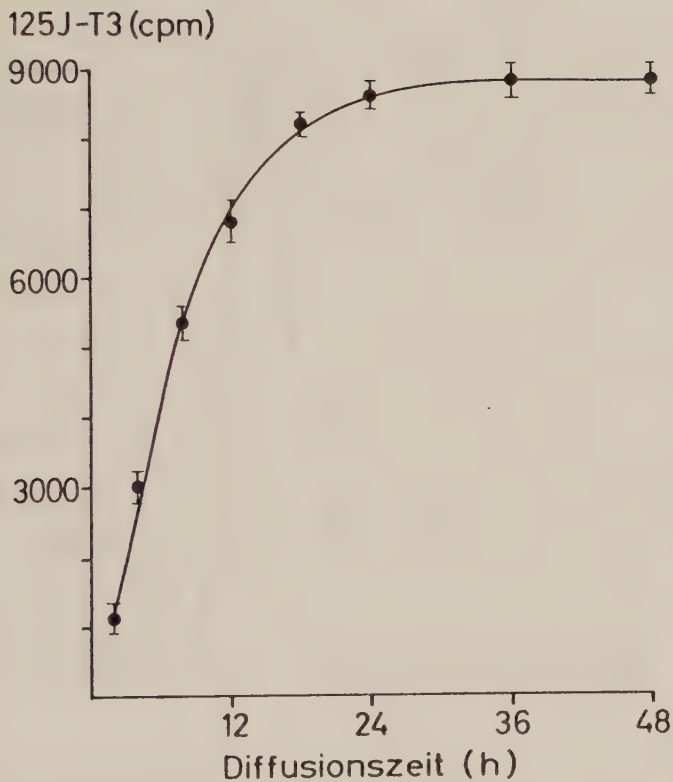


Abb. 7: $^{125}\text{J-T3}$ -Gleichgewichtsdialyse in einem Zweikompartimentsystem in Abhängigkeit der Diffusionszeit ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$).

3.1.5. Einfluß der T3-Bindung und der T3-Serumkonzentration

In Diffusionsversuchen mit 125J-T3, gelöst in nativem Serum, wurden maximal 25 % der zugesetzten Radioaktivität im Unterstand gefunden. Bei der Chromatographie des Serumüberstandes nach Beendigung der Diffusion auf einer Biogel P 100-Säule zeigte sich, daß das zugesetzte 125J-T3 an Proteine im Molekularbereich von ca. 10.000 bis 60.000 gebunden ist (Abb. 8).

Um die Plasmaeweißbindung zu reduzieren, wurden folgende Möglichkeiten untersucht:

- Inaktivierung von TBG durch Erhitzen des Serums auf 56°C für 60 Minuten.
- Serumproteindenaturierung durch absoluten Äthanol (100 µl)
- Verdrängung des T3 aus der Serumeiweißbindung durch Diphenylhydantoin (Epanutin®, 5 mg/Töpfchen).
- Fällung der Serumproteine durch 50 %-iges Polyäthylenglykol und Lösen des Präzipitats in Earles-Puffer.
- BSA- (50 g/l) und g-Globulin-Lösung (10 g/l) als Inkubationslösung.

Dabei zeigte sich, daß das T3 im Gegensatz zu g-Globulinen stark an Serumalbumin gebunden wird (Abb. 9). Auf die Serumeiweißbindung zeigte nur die Hitzeinaktivierung des TBG mit einer Steigerung der Recovery um 15 % einen deutlichen Einfluß. Parallel dazu nahm in der Säulenchromatographie die proteingebundene Radioaktivität ab.

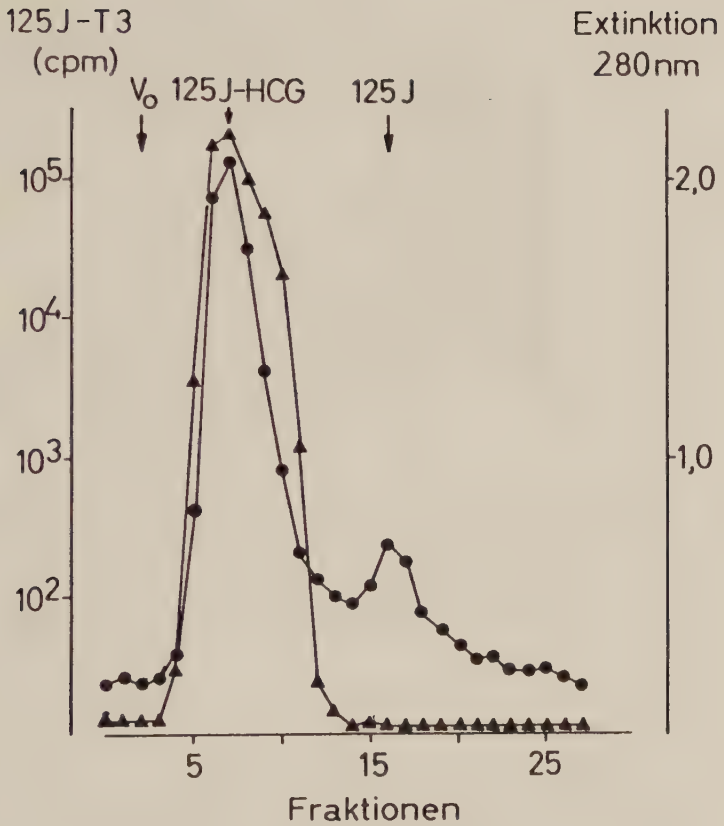


Abb. 8: Fraktionierung von 125J-T3-haltigem, gepooltem Normalserum über Biogel P 100. Darstellung des 125J - (●) und Proteingehalts mittels UV-Spektrometrie (▲).

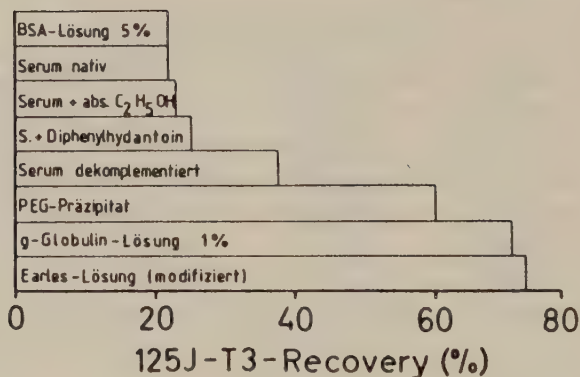


Abb. 9: Proteinbindung von ^{125}J -T3 in PEG-Präzipitat, BSA-, g-Globulin- und Earles-Lösung und verschiedenen vorbehandeltem Patientenserum, dargestellt durch die Recovery nach 24 Stunden Diffusion.

Die Abhängigkeit des frei dialysierbaren fT3 im Unterstand vom Gesamt-T3 des eingesetzten Serums wurde mit Hilfe von Diffusionsversuchen bei 19 euthyreoten (T3 0,8 - 2,3 ng/ml) und 27 hyperthyreoten Patienten (T3 2,4 - 6,9 ng/ml) untersucht. Es zeigte sich ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen fT3 und Gesamt-T3 im Serum (Lineare Regression, $r = 0,79$, $p < 0,001$; siehe Abb. 10).

Bei der Verdünnung des Patientenserums P.G. (Gesamt-T3 6,9 ng/ml) mit Normalserum (Gesamt-T3 1,6 ng/ml) zeigte sich, entsprechend dem Verdünnungsfaktor, ein Abfall des im Dialysat nachweisbaren fT3.

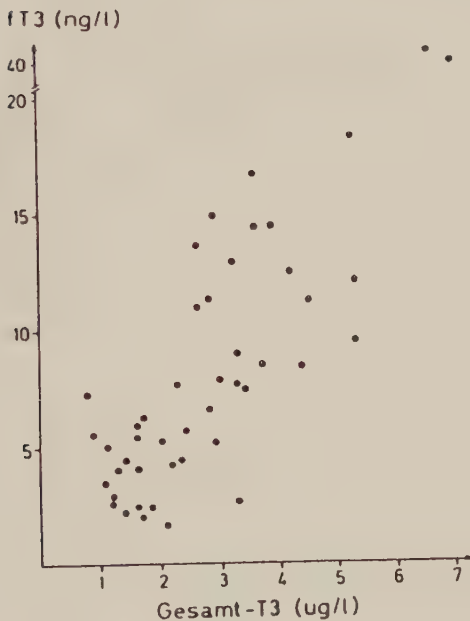


Abb. 10: Korrelation von fT3, bestimmt durch Gleichgewichtsdialyse, und radioimmunologisch gemessenem Gesamt-T3 im Serum ($n = 46$, $r = 0,79$, $p < 0,001$).

3.1.6. Optimierung des T3-Radioimmunoassay

3.1.6.1. Sensitivität

Die Bindungsfähigkeit des T3-Antikörpers (Antikörper I) wurde mit Verdünnungsstufen im Bereich von 1:10.000 bis 1:640.000 untersucht. Bei einer Verdünnung von 1:40.000 wurde eine Bindung von 25 % erreicht.

Das Anti-Kaninchen-g-Globulin (Antikörper II) wurde in Verdünnungen 1:5 bis 1:80 zusammen mit stabilisierendem Kaninchenserum 1:50 bis 1:200 im RIA getestet. Die maximale Bindungsfähigkeit lag bei einem Titer von 1:40 mit stabilisierendem Kaninchenserum 1:150. Die Abhängigkeit der Bindungsfähigkeit der Antikörper I und II von der Inkubationszeit und -temperatur ist in Abb. 11 dargestellt. Aufgrund dieser Daten wurde die Inkubation mit dem Antikörper I über 20 Stunden bei Raumtemperatur und mit dem Antikörper II über 5 Stunden bei 4°C durchgeführt.

Die Reduzierung der Tracermenge führt nach Hunter (43) zur Steigerung der Sensitivität eines RIAs. Durch verschiedene Ansätze mit 50 µl, 100 µl und 200 µl Tracer konnte dies in unserem T3-RIA bestätigt werden. Da mit Abnahme der Impulsraten die Präzision des Assays sinkt, wählten wir als unteres Limit 50 µl Tracer.

Eine verspätete Zugabe von Tracer zu Antigen und T3-Antikörper (sog. kalte Vorinkubation) von 2 bis 48 Stunden steigerte in diesem System die Empfindlichkeit nicht.

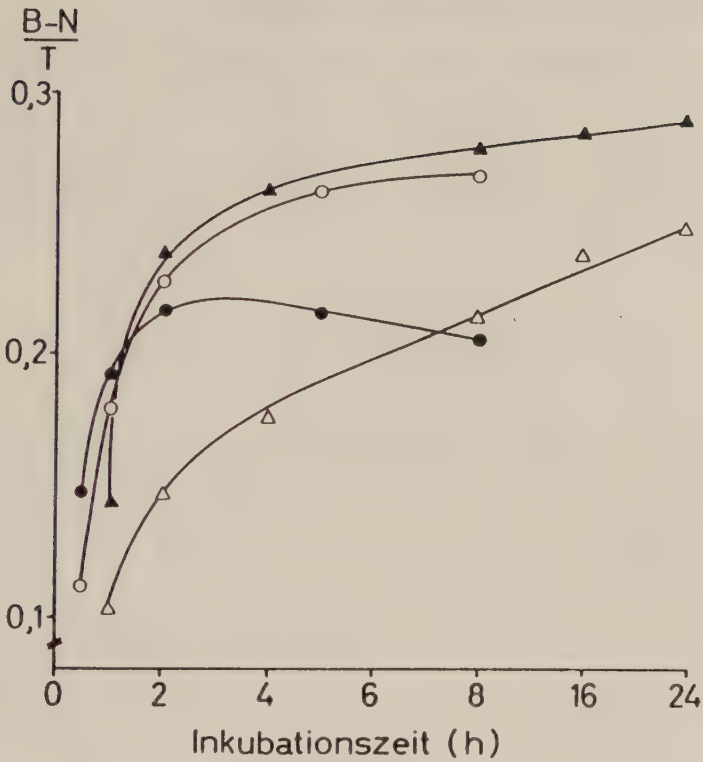


Abb. 11: Einfluß von Inkubationszeit und -temperatur auf die Bindungsfähigkeit von Antikörper I ($\Delta, \blacktriangle$) und II ($\circ, \bullet$).
Inkubationstemperatur 4 °C: offene Symbole
Inkubationstemperatur 20 °C: geschlossene Symbole

3.1.6.2. Qualitätskontrolle des RIA

Die laufende Qualitätskontrolle erfolgte anhand der mittleren spezifischen Bindung, unspezifischen Bindung, Glättungsfaktor und Wendepunkt der Standardkurve. In jedem Assay wurden außerdem vier T3-Verdünnungen in Vierfachbestimmung als Kontroll-Lösungen in folgenden Bereichen mitgeführt:

Kontroll-Lösung 1:	10 ug/l
Kontroll-Lösung 2:	1 ug/l
Kontroll-Lösung 3:	100 ng/l
Kontroll-Lösung 4:	20 ng/l

Aus Mittelwert, Standardabweichung und Vielfachheit der Ansätze ließen sich der Intra- (n = 4) und Interassayvariationskoeffizient (n = 30) nach Rodbard (77) berechnen (siehe Tab. 4).

	Intraassay- VK	Interassay- VK
Kontroll-Lösung 1	4,2 %	7,5 %
Kontroll-Lösung 2	3,0 %	7,4 %
Kontroll-Lösung 3	9,0 %	12,0 %
Kontroll-Lösung 4	10,2 %	16,7 %

Tab. 4: Inter- und Intraassayvariationskoeffizienten der Kontrollen 1 - 4 im T3-Radioimmunoassay.

Die untere Nachweisgrenze ist definiert als T3-Konzentration für die nach Abzug der unspezifischen Bindung gilt:

$$B < B_0 - 3s \text{ mit}$$

B = arithmetisches Mittel der Zählrate der T3-Probe

B_0 = arithmetisches Mittel der Zählrate des Standard-leerwertes

s = Standardabweichung der B -Werte

Sie lag in dem unter 2.1.2.4. beschriebenen System bei 2 ng/l.

Die Richtigkeit des Radioimmunoassays wird durch den Parallelitäts- und Wiederfindungstest geprüft (43,77).

Die Prüfung der Parallelität erfolgt durch die Verdünnungsreihe einer Probe. Dabei muß die gemessene Konzentration des T3 entsprechend dem Verdünnungsfaktor abnehmen. Das Ergebnis des Parallelitätstests ist in Abb. 12 dargestellt. Der Korrelationskoeffizient zwischen den im RIA ermittelten Hormonkonzentrationen und den theoretisch zu erwartenden Idealwerten beträgt 0,98.

Beim Wiederfindungstest wurde dem T3-Standard mit 20 ng/l Trijodthyronin zugesetzt, so daß sich theoretisch als T3-Konzentrationen 20 ng/l bis 12,5 µg/l ergaben. Die Steigung der Regressionsgeraden, die idealerweise 1,0 beträgt, wurde in unserem Radioimmunoassay mit 0,95 ermittelt (siehe Abb. 13).

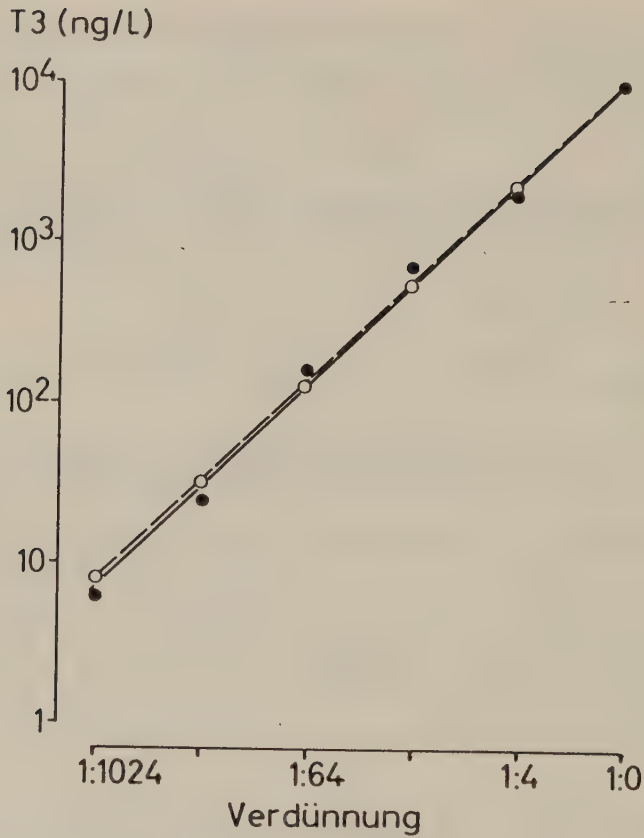


Abb. 12: Im T3-RIA ermittelte Hormonkonzentration (●—●) einer Verdünnungsreihe der T3-Kontroll-Lösung mit 10 ug/l im Vergleich zur rechnerisch ermittelten Idealgerade (○—○).

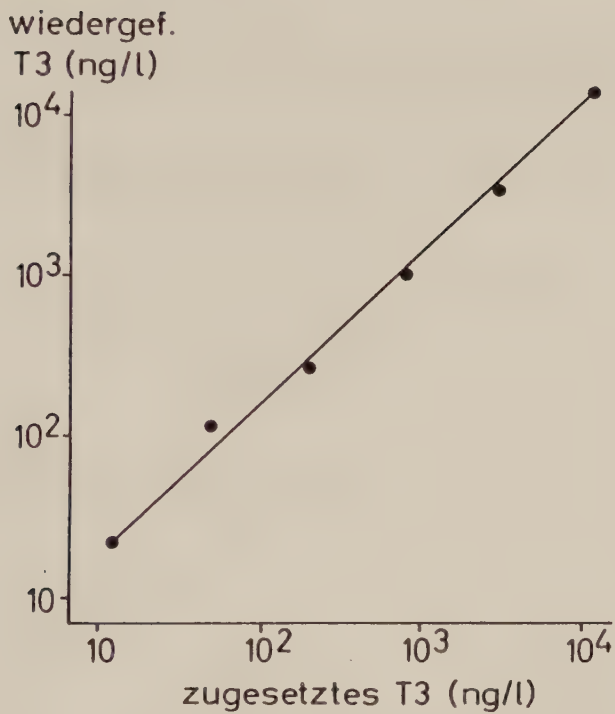


Abb. 13: Wiederfindung von T3 im Radioimmunoassay, das der T3-Kontroll-Lösung mit 20 ng/l zugesetzt wurde.

3.1.7. Qualitätskontrolle des Bioassays

Für die laufende Qualitätsüberwachung der Assays wurden folgende Kontrollen mitgeführt:

- Negativkontrolle: Seren von 50 schilddrüsengesunden Patienten wurden zu einem Nullserum-pool vereinigt.
- Positivkontrolle: Serum eines Patienten mit gesichertem M. Basedow wurde für die Kontrolle der Stimulierbarkeit des Gewebes durch TSA_b verwendet.
- TSH-Verdünnung: bTSH wurde im Nullserumpool gelöst und in den Verdünnungsstufen 0,01 U/l, 0,1 U/l, 1,0 U/l und 10 U/l mitgeführt.

Versuche wurden nur gewertet, wenn die fT₃-Freisetzung durch 1,0 U/l bTSH den 2s-Bereich der Negativkontrolle überstieg.

Die Intraassayvarianz wurde bestimmt aus den einzelnen fT₃-Werten der Negativkontrolle. Sie betrug im menschlichen Gewebe 15 % (n = 8), in Schweineschilddrüsen 14 % (n = 8).

Die Interassayvarianz wurde berechnet aus der Positivkontrolle, die in jedem Versuch mitgeführt wurde. Für das System mit Schweinegewebe ergab sich eine Interassayvarianz von 31 % (n = 16) bzw. 33 % (n = 15) mit menschlichen Schilddrüsenschnitten.

Im Bioassay wurden 60 Patientenseren mit Schweinegewebe bzw. 21 Proben mit menschlichen Schilddrüsenschnitten in einem 2. Versuchsansatz erneut getestet. Dabei fanden sich in 52/60 (87 %) im Schweinesystem und in 19/21 (90%) im humanen Bioassay konkordante Ergebnisse (siehe Tab. 5). Die Seren mit diskordantem Verhalten in zwei verschiedenen Ansätzen zeigten eine grenzwertige TSAb-Aktivität (20 %-40 %).

	Schweinesystem	Humansystem
TSAb positiv:		
konkordant	22/26 (85 %)	5/6 (83 %)
diskordant	4/26 (15 %)	1/6 (17 %)
TSAb negativ:		
konkordant	30/34 (88 %)	14/15 (93 %)
diskordant	4/34 (12 %)	1/15 (7 %)

Tab. 5: Anteil von konkordanten bzw. diskordanten Ergebnissen bei Retestung von TSAb-positiven bzw. -negativen Patientenseren in einem 2. Versuchsansatz mit Schweine- bzw. menschlichem Schilddrüsengewebe.

3.2. Einflußgrößen des Bioassay

3.2.1. TSH

Wie unter 3.1.7. angegeben, wurde in jedem Versuchsansatz die Wirkung von bTSH (Präparation Dr. Pierce, Los Angeles; biologische Aktivität 30 U/mg) in Konzentrationen von 0,01 bis 10 U/l auf die Stimulation des Schilddrüsengewebes überprüft. bTSH zeigte dabei eine dosisabhängige Wirkung auf die T3-Freisetzung in menschlichem und Schweinegewebe (Abb. 14). Die untere Nachweisgrenze für bTSH lag bei 0,3 U/l im Human-Assay und 0,1 U/l im Schweine-Bioassay. Die maximale Stimulation lag in beiden Systemen zwischen 1-5 U/l bTSH mit einem relativen Anstieg des sezernierten fT3, bezogen auf den Basalwert, um $85 \% \pm 36 \% (\bar{x} \pm s, n = 24)$ in menschlichen und $93 \% \pm 51 \% (\bar{x} \pm s, n = 29)$ in Schweineschilddrüsen. Die basale fT3-Freisetzung im Schweinegewebe war größer als die des humanen Strumagewebes.

Der Einfluß von hTSH in physiologischen Konzentrationen wurde anhand der Seren von 6 Patienten mit Zustand nach Thyreoidektomie wegen Struma maligna und hypothyreoter Stoffwechsellaage vor Radiojodtherapie untersucht. Die radioimmunologische Bestimmung im Institut für Klinische Chemie, Klinikum Großhadern, (TSH-RIA, Fa. Henning, Berlin) ergab TSH-Konzentrationen von 32 mU/l - 48 mU/l (Medianwert 43 mU/l) in diesen Seren. Die Untersuchung im Bioassay zeigte, daß keines dieser Seren in der Lage war, die T3-Freisetzung über den 2s-Bereich der Negativkontrolle zu stimulieren.

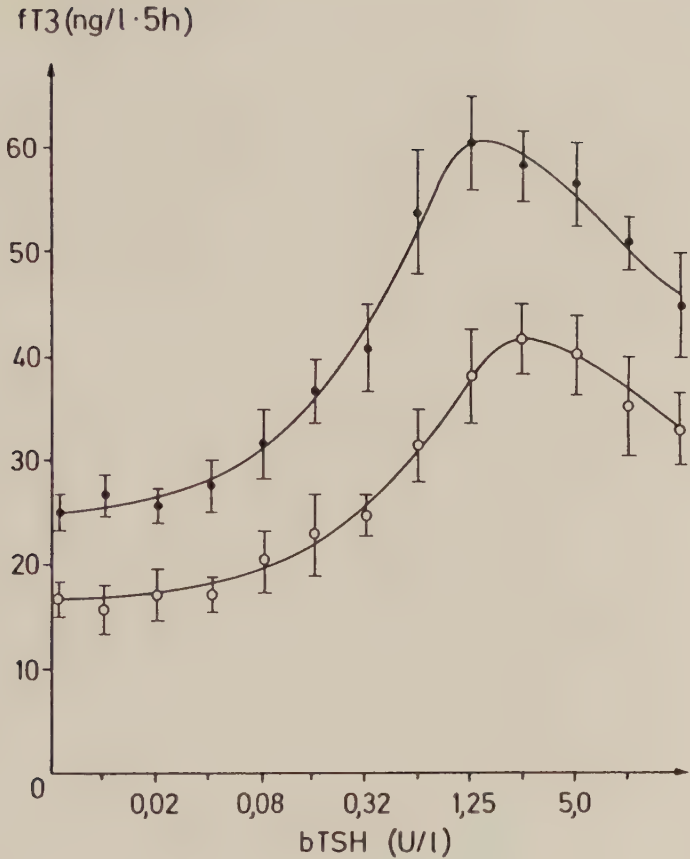


Abb. 14: Einfluß von in gepooltem Normalserum gelöstem bTSH auf die T3-Freisetzung aus menschlichen (○) und Schweineschilddrüsenschnitten (●), (n = 5, $\bar{x} \pm s$).

3.2.2. Seren von Patienten mit M. Basedow

Die Sensitivität des Bioassays wurde mit 23 Seren von Patienten mit gesichertem M. Basedow (siehe Tab. 1) untersucht. Sämtliche Patienten befanden sich im aktiven Erkrankungsstadium vor Beginn der thyreostatischen Therapie. Basedow-Seren zeigten beim Einsatz verschiedener Volumina (10 μ l - 100 μ l, jeweils mit Nullserum ad 100 μ l) eine dosisabhängige Wirkung auf die T3-Freisetzung im menschlichen und Schweinegewebe (Abb. 15).

Die mittlere TSAb-Aktivität in diesen 23 Patientenseren lag in menschlichen Schnitten bei $62 \% \pm 28 \% (\bar{x} \pm s)$ bzw. $64 \% \pm 39 \% (\bar{x} \pm s)$ in Schweineschilddrüsen. Die mittlere TSAb-Aktivität bei Patienten ohne Schilddrüsenerkrankung ($n = 15$) lag dagegen bei $10 \% \pm 9 \%$ bzw. $15 \% \pm 8 \% (\bar{x} \pm s)$. Die statistische Auswertung nach dem Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben (102) ergab einen hochsignifikanten Unterschied ($p < 0,001$) zwischen diesen beiden Kollektiven, sowohl bei Verwendung von Schweineschilddrüsen als auch von Struma diffusa-Gewebe. Dies zeigt, daß mit dem Bioassay die Präsenz von schilddrüsenstimulierenden Antikörpern erfaßt werden kann.

3.2.3. Sensitivität und Spezifität der TSAb-Bestimmung

Bei 21/23 Patientenseren mit aktiver Erkrankung konnten TSAb im Bioassay mit menschlichem bzw. Schweinegewebe nachgewiesen werden. Die Sensitivität beider Systeme liegt damit bei 91 % in dieser Patientengruppe.

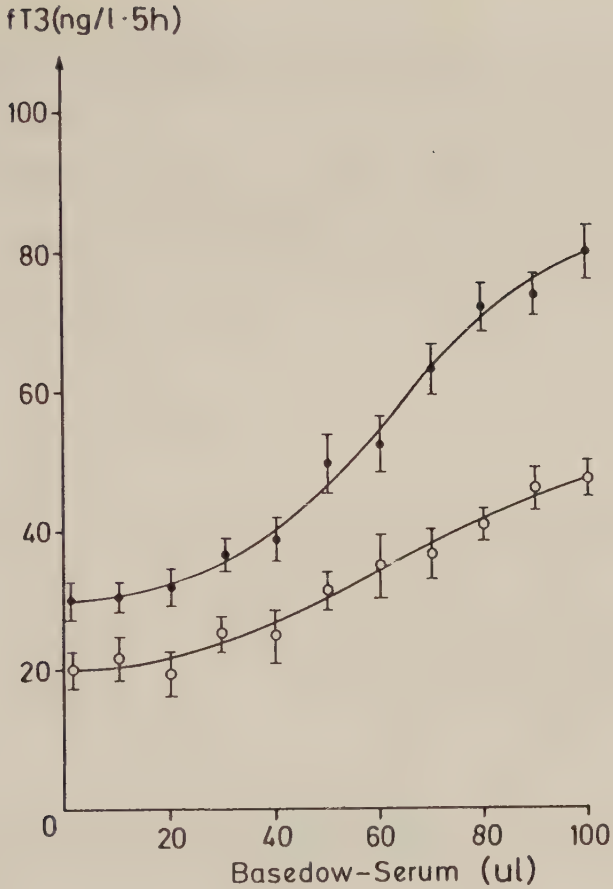


Abb. 15: Dosisabhängige T3-Freisetzung durch Basedow-Seren aus menschlichem (O) und Schweinegewebe (●), ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$).

Die Spezifität des Bioassays wurde an 15 gesunden Personen und an 45 Patienten mit Schilddrüsenerkrankungen, die in folgende Untergruppen gegliedert werden konnten, überprüft:

- Patienten mit euthyreoter Struma diffusa (n = 16),
- Patienten mit autonomen Adenomen (n = 13),
- Patienten mit Z.n. Thyreoidektomie wegen Struma maligna (n = 6).

Das Ergebnis ist in Tab. 6 zusammengefaßt:

	hTSAb	pTSAb
Patienten ohne Schilddrüsenerkrankung	1/15	1/15
Patienten mit Struma diffusa	1/16	2/16
Patienten mit autonomen Adenomen	1/13	1/13
Patienten nach Thyreoidektomie wegen Struma maligna	0/ 6	0/ 6

Tab. 6: Anteil von positivem Antikörper-Nachweis im Bioassay mit menschlichem (hTSAb) und Schweine-schilddrüsengewebe (pTSAb) bei Patienten ohne Anhalt für M. Basedow.

Eine Auswertung der TSAb-Aktivitäten mit Hilfe des Wilcoxon-Testes für unverbundene Stichproben ergab in keiner Untergruppe einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe von Patienten ohne Schilddrüsenerkrankung. Die Spezifität des Bioassays beträgt damit 94 % im humanem System bzw. 92 % bei Verwendung von Schweinegewebe. Die Anwendung des nach McNemar modifizierten Vorzeichentests (79) ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen beiden Systemen ($p = 1,0$).

3.2.4. Isoliertes IgG

Um unspezifische Serumeinflüsse auf den Bioassay zu erkennen, wurden Gesamtserum und isoliertes Immunglobulin G von Patienten mit M. Basedow im Vergleich untersucht.

IgG von 5 Seren mit positivem und 3 Seren mit negativem TSAb-Nachweis im Serum von Patienten mit M. Basedow wurde affinitätschromatographisch über Protein A-Sepharose isoliert. Es wurden jeweils 100 μ l Serum bzw. IgG-Lösung in den Bioassay eingesetzt. Es fand sich bei allen Patientenserumseren ein konkordantes Ergebnis zwischen Gesamtserum und IgG. Abb. 16 zeigt die Dosisabhängigkeit des Gesamtserums und des isolierten Immunglobulins eines Patienten mit frischem M. Basedow (D.C., q, 49 J.) im identischen Schilddrüsengewebe. Dies läßt den Schluß zu, daß die Verwendung von Gesamtserum anstelle des isoliertem Immunglobulins im Bioassay möglich ist.

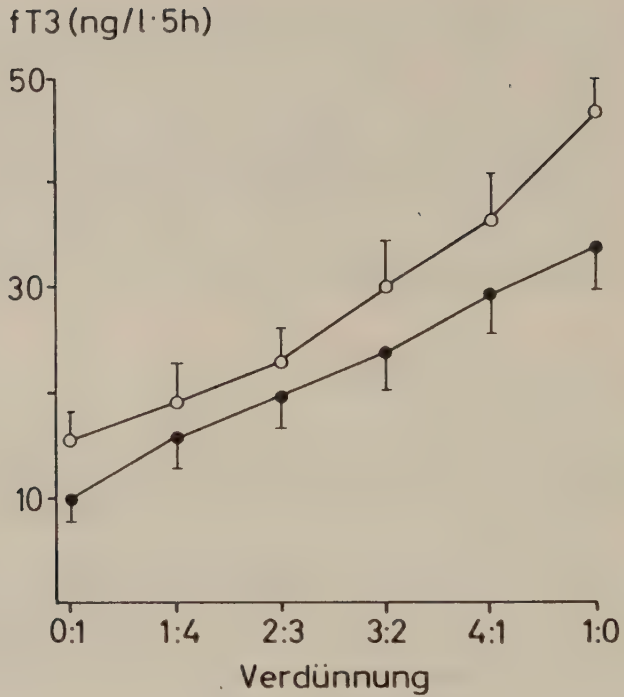


Abb. 16: Dosisabhängigkeit des Gesamtserums (●—●) bzw. isoliertem IgGs (○—○) eines Patienten mit M. Basedow (D.C., ♀, 49 J.) im identischen Schilddrüsengewebe ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$).

3.2.5. Unspezifische Faktoren

Bei Verwendung von unfraktioniertem Patientenserum muß der Einfluß von Serumbestandteilen, die möglicherweise die fT3-Freisetzung unspezifisch verändern, auf den Bioassay überprüft werden. Hierbei sind besonders folgende Faktoren zu berücksichtigen:

- endogenes hTSH (siehe 3.2.1.),
- Methimazol bei Patienten unter thyreostatischer Therapie,
- unspezifische Hemmfaktoren bzw. normales IgG.

Methimazol wirkt in vivo als Thyreostatikum und wird zur Therapie der Hyperthyreose eingesetzt (60). Da der Bioassay auf dem Prinzip der Stimulation von intaktem Schilddrüsengewebe mit konsekutiver Hormonausschüttung beruht, muß der Einfluß der in Patientenseren enthaltenen Methimazoldosen auf das System untersucht werden.

Methimazol-Lösung (Favistan®-Ampullen, 40 g/l) wurde zu diesem Zweck mit Earles-Puffer auf Konzentrationen zwischen 3 mg/l und 25 mg/l verdünnt. Jeweils 20 µl dieser Lösungen wurden 1 ml Basedow-Serum bzw. Normalserum (ohne bTSH und mit 1 U/l bTSH) zugesetzt und damit der Bereich der therapeutischen Plasmaspiegel in vivo abgedeckt. Das Ergebnis ist in Abb. 17 dargestellt. Es konnte keine Hemmung der T3-Freisetzung durch Methimazol in Konzentrationen von 60 bis 500 µg/l Serum gefunden werden.

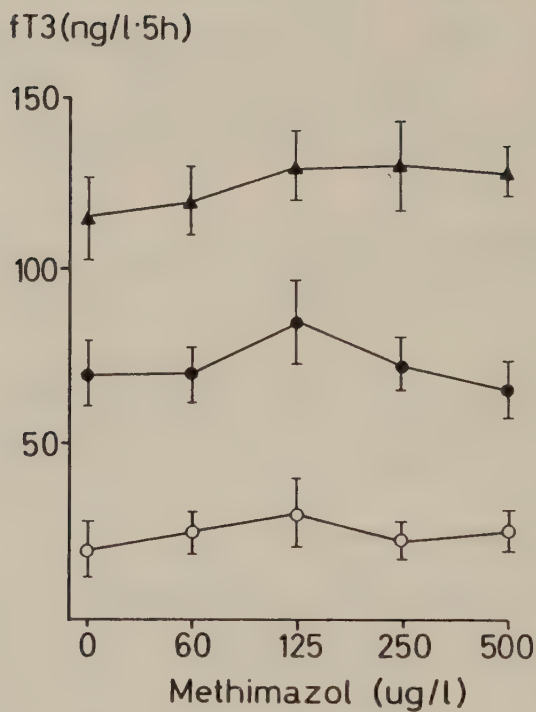


Abb. 17: Einfluß von Methimazol auf die T3-Freisetzung aus Schweineschilddrüsen durch Normalserum (○), Normalserum mit 1,0 U/l bTSH (●) und einem Basedow-Serum (▲), ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$).

Um die Einflüsse von unspezifischen Hemmfaktoren im Serum und von normalen IgG zu überprüfen, wurden im identischen Schweineschilddrüsengewebe bTSH-Standardverdünnungen (0-10,0 U/l) in zwei verschiedenen Lösungsmedien getestet:

a) modifizierter Earles-Puffer mit Gelatine 5 g/l
(siehe Anhang)

b) Normalserumpool, wie üblich für 60 Minuten bei 56 °C vorerhitzt (IgG-Konzentration 13 g/l).

Das Ergebnis ist in Abb. 18 dargestellt.

Es zeigte sich in beiden TSH-Lösungen eine maximale, relative Stimulation bei 1,0 U/l bTSH von 300 % (Serum) bzw. 280 % (Earles-Puffer). Die absolute fT3-Konzentration im Unterstand lag bei Verwendung von Puffer 2,3- bis 2,7-fach höher als im Serumsystem.

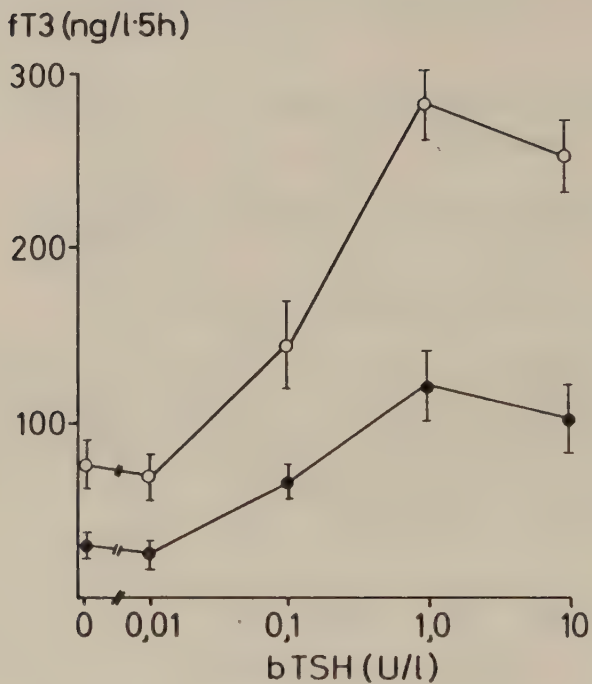


Abb. 18: Dosisabhängige Stimulation von Schweine-schilddrüsengewebe mit bTSH, das in Normalserum (●) bzw. modifiziertem Earles-Puffer (O) gelöst wurde ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$).

3.3. Speziesspezifität

Um den Einfluß der Spezies des verwendeten Gewebes auf die Ergebnisse im Bioassay zu überprüfen, wurde die T3-Freisetzung aus Schweineschilddrüsen und humanem Struma diffusa-Gewebe durch bTSH verglichen (vgl. 3.2.1.). Außerdem wurde die Stimulation durch die Seren der Patienten mit frischem M. Basedow vor Therapie zur Klärung obiger Frage herangezogen. Die Daten sind in Tab. 7 zusammengefaßt.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gewebearten bei der T3-Freisetzung durch bTSH beobachtet werden. Daneben fand sich in der Gruppe der unbehandelten Patienten mit aktivem M. Basedow eine identische Sensitivität und vergleichbare Stimulation durch TSAb. Darüberhinaus ergab die Auswertung mit Hilfe der linearen Regression (79), die in Abb. 19 dargestellt ist, einen hochsignifikanten Zusammenhang zwischen pTSAb- und hTSAb-Index mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,74$ und $p < 0,01$.

	Schweine- gewebe	humanes Gewebe
bTSH:		
untere Nachweisgrenze	0,1 U/l	0,3 U/l
maximale Stimulation bei	1-5 U/l	1-5 U/l
maximaler relativer T3- Freisetzung ($\bar{x} \pm s$)	93 % $\pm$ 51 %	85 % $\pm$ 36 %
Patientenseren:		
Inzidenz	91 %	91 %
maximale relative T3- Freisetzung ($\bar{x} \pm s$)	64 % $\pm$ 39 %	62 % $\pm$ 28 %

Tab. 7: Zusammenfassung der Daten zur Stimulation von Schweineschilddrüsen- und menschlichem Struma diffusa-Gewebe mit bTSH und 23 Seren von Patienten mit aktivem M. Basedow vor Therapie.

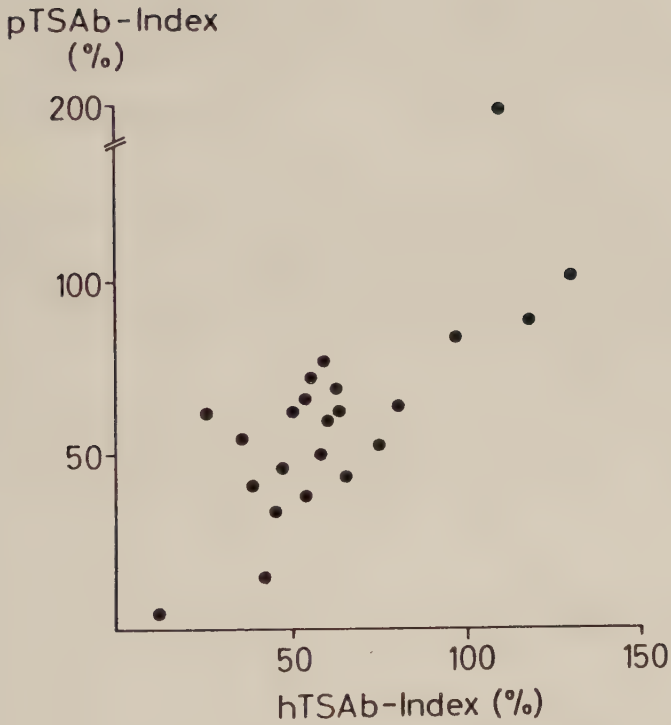


Abb. 19: Korrelation von hTSAb- und pTSAb-Aktivität in Seren von 23 Patienten mit aktivem, unbehandeltem M. Basedow ($r = 0,74$; $p < 0,01$).

3.4. Präzision des Radiorezeptorassays

Die Bindungsfähigkeit der Rezeptorenpräparationen für 125J-TSH lag bei $24\% \pm 5\%$ ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$) und damit im unteren Bereich der vom Hersteller angegebenen Norm (20 bis 40 %).

Die unspezifische Bindung in Lubrol-Lösung lag bei $5,4\% \pm 1,1\%$ ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$).

In jedem Versuchsansatz wurde neben der Negativkontrolle und Positivkontrolle des Herstellers ein Basedow-Serum als Kontrolle mitgeführt. Die Positivkontrolle enthielt 400 U/l bTSH. Die Inter- und Intraassayvarianz ist in Tab. 8 zusammen gefaßt.

	Intraassay-VK n = 4	Interassay-VK n = 9
Negativkontrolle (TBII-Index = 7)	6 %	26 %
Basedow-Serum (TBII-Index = 20)	5 %	22 %
Positivkontrolle (TBII-Index = 51)	1 %	11 %

Tab. 8: Intraassay- und Interassayvariationskoeffizient des Radiorezeptorassays.

23 Patientenseren wurden in zwei verschiedenen Versuchsansätzen getestet. Dabei erwiesen sich 18 Proben in beiden Kits als positiv (mittlerer TBII-Index = 45 %) bzw. als negativ (mittlerer TBII-Index = -12 %). 5 Serumproben zeigten diskordante Ergebnisse. Ihr mittlerer TBII-Index lag mit 12 % im Grenzbereich.

In einer 2. Versuchsreihe wurde der Einfluß einer Standardisierung des Assays mit bTSH auf die Präzision untersucht. Parallel zu einem positiven Kontrollserum wurde ein TSH-Standard mit 15 U/l bTSH in Serum mitgeführt. Der Interassay-Variationskoeffizient ($n = 7$) betrug sowohl für die Positivkontrolle (mittlerer F-Index: 28) als auch den TSH-Standard (mittlerer F-Index: 18) 22 %. Dagegen lag der Interassay-Variationskoeffizient des Quotienten $F\text{-Index (Positivkontrolle)} / F\text{-Index (TSH-Standard)}$ bei 12 %, als Ausdruck der parallelen Schwankung der beiden Indices in den einzelnen Ansätzen.

3.5. Einflußgrößen des Radiorezeptorassays

3.5.1. TSH

bTSH zeigte im Radiorezeptorassay eine dosisabhängige Verdrängung des markierten 125J-TSH vom Rezeptor (siehe Abb. 20).

gebundenes
125J-TSH (%)

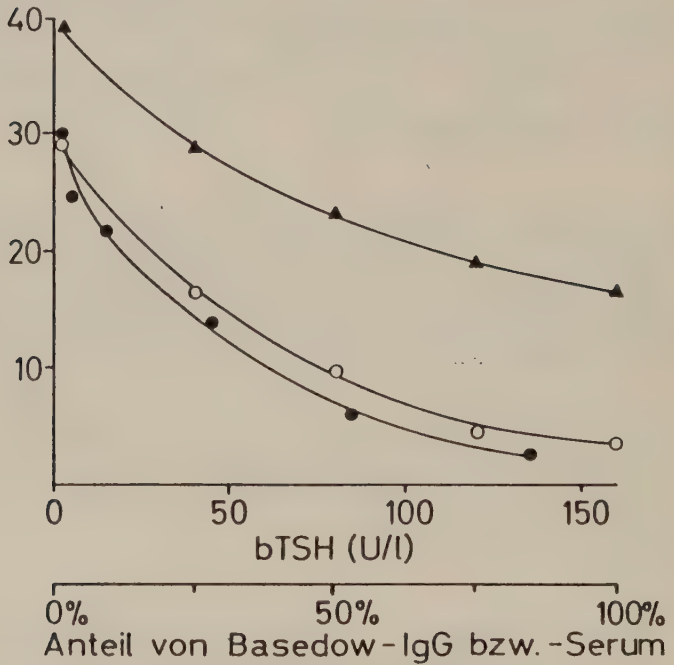


Abb. 20: Dosisabhängige Verdrängung von 125J-TSH im Radiorezeptorassay durch bTSH, gelöst in Normalserum (●—●), Basedow-Serum (○—○) und Basedow-IgG (Δ—Δ). Die Verdünnung des Basedow-Serums bzw. -Immunglobulins erfolgte mit Normalserum bzw. daraus über Protein A-Sepharose isoliertem IgG.

Die untere Nachweisgrenze für bTSH wurde analog zu 3.1.6.2. definiert als

$$B < B_0 - 3s \quad \text{mit}$$

B_0 = spezifisch gebundenes 125J-TSH in Abwesenheit von kaltem TSH

B = spezifisch gebundenes 125J-TSH bei Zusatz von kaltem TSH

s = Standardabweichung

Die untere Nachweisgrenze lag bei $2,4 \pm 0,3$ U/l ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$) bTSH.

Die halbmaximale Verdrängung kann bestimmt werden durch die Formel

$$B / B_0 = 0,5$$

Sie lag bei 24 ± 5 U/l ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$) für bTSH.

Der Einfluß von hTSH wurde mit Seren von Patienten mit Z.n. Thyreoidektomie wegen Struma maligna ($n = 35$) überprüft. Es fand sich kein Zusammenhang zwischen TBII-Index und basalen hTSH-Spiegeln bis 50 mU/l (siehe Tab. 9).

Basaler TSH-Spiegel	n	TBII-Index ($\bar{x} \pm s$)
0 - 10	5	6 $\pm$ 8
11 - 20	6	10 $\pm$ 12
21 - 30	6	11 $\pm$ 16
31 - 40	7	10 $\pm$ 15
41 - 50	11	6 $\pm$ 7

Tab. 9 : TBII-Index in Abhängigkeit vom basalen TSH-Spiegel bei 35 Patienten mit Z.n. Thyreoidektomie wegen Struma maligna.

3.5.2. Seren von Patienten mit M. Basedow

Im Radiorezeptorassay konnte eine dosisabhängige Verdrängung von ^{125}J -TSH durch Basedow-Seren und Basedow-IgG gezeigt werden (siehe Abb. 20). Die Verdünnung des Basedow-Serums bzw. -IgGs erfolgte durch Zusatz von Normalserum bzw. daraus isoliertem Immunglobulin (siehe 2.1.4.). Es zeigte sich eine lineare Beziehung zwischen der Verdünnung des TBII-positiven Patientenserums und der bTSH-Verdünnungsreihe ($r = 0,98$).

Die mittlere TBII-Aktivität im Serum von 23 Patienten mit aktivem, unbehandeltem M. Basedow betrug $36 \% \pm 22 \% (\bar{x} \pm s)$.

Bei einer Kontrollgruppe von 39 Patienten ohne Hinweis auf das Vorliegen einer Schilddrüsenerkrankung lag der mittlere TBII-Index bei $7 \% \pm 9 \% (\bar{x} \pm s)$. Der statistische Vergleich dieser beiden Kollektive mit Hilfe des Wilcoxon-Tests für unverbundene Stichproben ergab einen hochsignifikanten Unterschied ($p < 0,001$). Dies läßt den Schluß zu, daß mit dem Radiorezeptorassay TSH-verdrängende Immunglobuline im Serum von Patienten mit M. Basedow nachgewiesen werden können.

3.5.3. Sensitivität und Spezifität der TBII-Bestimmung

Die Sensitivität des Radiorezeptorassays in Hinblick auf die Erkennung von TBII wurde anhand von 23 Patienten mit gesichertem, aktivem M. Basedow vor thyreostatischer Therapie (siehe Tab. 1) überprüft.

Bei 19 dieser Patienten konnten im Radiorezeptorassay TBII nachgewiesen werden. Die Sensitivität für TBII lag damit in diesem Patientenkollektiv bei 83 %. Im Vergleich zur Sensitivität des Bioassays (91 %) ergab sich kein signifikanter Unterschied (Vorzeichentest nach McNemar, (79)).

Die Spezifität des Radiorezeptorassays wurde durch Seren von 221 Patienten, die entsprechend Tab. 10 untergliedert wurden, überprüft. Die Bestimmungen wurden in 15 konsekutiven Assays durchgeführt. Dabei fand sich ein Anteil von positiven Ergebnissen mit einem TBII-Index $> 15 \%$ zwischen 13 und 22 % (siehe Tab. 10). Auffallend war eine deutliche Chargenabhängigkeit der Spezifität des Radiorezeptorassays. Abhängig von Membranpräparation und ^{125}J -TSH-Markierung wurden Werte zwischen 60 % und 95 % gefunden.

Der Vergleich der Spezifität des Radiorezeptorassays und Bioassays mit Human- und Schweineschilddrüsengewebe mit Hilfe des Vierfelder-Chi-Quadrat-Tests (102) ergab einen signifikanten Unterschied mit $p = 0,07$ für den pTSAb-Assay und $p = 0,03$ für den hTSAb-Bioassay bei Berücksichtigung der Gesamtkollektive. Bei der Analyse der Untergruppen mit identischer Diagnose war die Patientenzahl nicht ausreichend um statistisch signifikante Unterschiede zu erhalten.

TBII-Index >15 %

Pat. ohne Schilddrüsenerkrankung	5/39 (13 %)
Pat. mit Struma diffusa	11/51 (22 %)
Pat. mit Autonomie	10/64 (16 %)
Pat. mit Z.n. Thyreoidektomie wegen Struma maligna	11/67 (16 %)

Insgesamt	37/221 (17 %)
-----------	---------------

Tab. 10: Anteil positiver Ergebnisse im Radiorezeptorassay bei verschiedenen Kontrollgruppen ohne Anhalt für Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse.

3.6. Klinische Wertigkeit von TBII und TSAb

Die Inzidenz von Basedow-Autoantikörpern bei unbehandelten Patienten, bestimmt durch Radiorezeptor- und Bioassay, ist in Tab. 11 nochmals zusammengefaßt. Sie lag in allen Assays bei ca. 90 %. Jedes Serum war in mindestens einem Assay positiv. In 16/23 (70 %) Patienten vor Therapie fand sich TBII-, pTSAb- und hTSAb-Aktivität.

TBII	pTSAb	hTSAb	TBII∩pTSAb∩hTSAb	TBII∪pTSAb∪hTSAb
19/23	21/23	21/23	16/23	23/23
83 %	91 %	91 %	70 %	100 %

Tab. 11: Inzidenz von Autoantikörpern im Radiorezeptor-assay (TBII) und Bioassay mit menschlichem (hTSAb) und Schweinegewebe (pTSAb) bei Patienten mit frischem M. Basedow vor Therapie.

TBII konnten nachgewiesen werden bei 12/20 (60 %) der Patienten unter Therapie und 5/15 (33 %) in Remission. pTSAb bzw. hTSAb wurden in 8/20 (40%) bzw. 9/20 (45%) bei thyreostatisch behandelten Patienten und 4/15 (27%) bzw. 3/15 (20%) in Remission gefunden.

Die Inzidenz der Autoantikörper in der Remissionsgruppe unterschied sich statistisch nicht signifikant von der Kontrollgruppe der Patienten mit Struma diffusa (einseitiger Chi-Quadrat-Test für unverbundene Stichproben (79); TBII: $p = 0,18$, pTSAb: $p = 0,16$, hTSAb: $p = 0,13$).

Die mittlere Antikörperaktivität fiel bei allen Assays in der Therapiegruppe im Vergleich zum unbehandeltem Kollektiv mit aktiver Erkrankung ab und unterschied sich in der Remissionsgruppe nicht mehr signifikant (Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben (102), $p > 0,10$) von den Kontrollgruppen (Tab. 12). In einzelnen Patientenseren war allerdings trotz fehlender Hinweise für eine Persistenz des Krankheitsprozesses die Antikörperaktivität deutlich nachweisbar. Dabei handelt es sich bei 2/3 Patienten um eine euthyreote Orbitopathie Grad III-IV (101) nach Autoimmunhyperthyreose.

	TBII	pTSAb	hTSAb
vor Therapie	36% $\pm$ 22%	64% $\pm$ 39%	62% $\pm$ 28%
unter Therapie	21% $\pm$ 17%	28% $\pm$ 26%	34% $\pm$ 36%
in Remission	10% $\pm$ 11%	17% $\pm$ 18%	18% $\pm$ 23%

Tab. 12: Antikörperaktivitäten ($\bar{x} \pm s$) von TBII, pTSAb und hTSAb in den einzelnen Patientengruppen mit aktivem, unbehandeltem M. Basedow ($n = 23$), unter thyreostatischer Therapie ($n = 20$) und in Remission ($n = 15$).

Die übereinstimmenden Ergebnisse von Bioassay und Radiorezeptorassay in den einzelnen Patientengruppen sind in Tab. 13 zusammengefaßt.

	Patienten mit aktivem M. Basedow (n=23)	Patienten unter Thyreostatika (n=20)	Patienten in Remis- sion (n=15)
hTSAb/TBII	18 (78%)	5 (25%)	12 (80%)
pTSAb/TBII	18 (78%)	10 (50%)	12 (80%)
hTSAb/pTSAb/ TBII	16 (70%)	3 (20%)	7 (47%)

Tab. 13: Konkordant positive oder negative Ergebnisse des hTSAb-, pTSAb- und TBII-Assays bei Patienten mit aktivem M. Basedow vor Therapie, unter thyreostatischer Therapie und in Remission.

Konkordante Daten von TBII und pTSAb bzw. hTSAb fanden sich in 78 % im Rahmen des frischen Erkrankungsstadiums, in 50 % bzw. 25 % der Patienten unter Thyreostatika und in 73 % bzw. 80 % der Remissionsgruppe. Unterschiede zwischen den verschiedenen Assays ergaben sich überwiegend in der Patientengruppe unter thyreostatischer Medikation, besonders beim Vergleich von TBII und hTSAb. Die Ergebnisse des Vergleichs von TBII- und hTSAb- bzw. pTSAb-Aktivität in dieser Gruppe sind im Detail in Tab. 14 dargestellt.

		T B I I	
		positiv	negativ
hTSAb	positiv	3	6
	negativ	9	2
pTSAb	positiv	5	3
	negativ	7	5

Tab. 14: Vergleich von TBII und hTSAb bzw. pTSAb bei Patienten unter thyreostatischer Therapie (n = 20).

In der Gruppe von Patienten mit aktivem, unbehandeltem M. Basedow fand sich, wie in 3.3. dargelegt, eine signifikante Beziehung zwischen hTSAb- und pTSAb-Aktivität ($r = 0,74$; $p < 0,01$). Keine Signifikanz zeigte dagegen die Korrelation von TBII mit pTSAb ($r = -0,18$) bzw. hTSAb ($r = -0,20$).

Der Zusammenhang zwischen Autoantikörperaktivität und Höhe der peripheren Schilddrüsenhormone T3 und T4 wurde mit Hilfe der Spearman'schen Rangkorrelation (102) untersucht.

Das Ergebnis ist in Tab. 15 zusammengefaßt. Es fand sich eine signifikante Korrelation zwischen pTSAb- bzw. hTSAb-Index und T4 ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,02$) sowie T3 ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$). Im Gegensatz dazu konnte keine Signifikanz zwischen TBII-Aktivität und den peripheren Serumhormonen gefunden werden ($p > 0,10$).

	T3	T4
pTSAb-Assay	$r = 0,45$ ($p < 0,05$)	$r = 0,44$ ($p < 0,05$)
hTSAb-Assay	$r = 0,54$ ($p < 0,01$)	$r = 0,50$ ($p < 0,02$)
TBII-Assay	$r = -0,10$ ($p > 0,10$)	$r = 0,05$ ($p > 0,10$)

Tab. 15: Zusammenhang zwischen Basedow-Antikörperaktivität und Höhe der peripheren Schilddrüsenhormone im Serum von 23 Patienten mit aktivem, unbehandeltem M. Basedow. Statistische Auswertung mit Hilfe der Rangkorrelation nach Spearman (102).

Die Patientengruppe mit aktivem, unbehandeltem M. Basedow wurde in Hinblick auf erhöhte Titer von Thyreoglobulin- und mikrosomalen Antikörpern bzw. dem Vorliegen einer endokrinen Orbitopathie von mindestens Schweregrad III nach der American Thyroid Association (101) in Untergruppen gegliedert. Bei der Analyse nach dem Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben (102) fand sich allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen den TBII- und TSAb-Aktivitäten in den jeweils korrespondierenden Untergruppen.

4. Diskussion

4.1. Nachweismethoden für Antikörper bei M. Basedow

Im Gegensatz zur Schilddrüsenüberfunktion bei Autonomie liegt die Ursache für die Hyperthyreose des M. Basedow im Auftreten von Antikörpern gegen den TSH-Rezeptor bzw. analogen Komponenten der Thyreozytenmembran. Sie sind in der Lage, in Thyreozyten, ähnlich dem TSH, verschiedene Funktionen zu stimulieren. Dies wurde zum Nachweis dieser Immunglobuline ausgenützt, wobei verschiedene Methoden entwickelt wurden, die auf der Bindung an den TSH-Rezeptor, der Aktivierung der Adenylatzyklase, der Kolloidendozytose, der Hormonsekretion und der DNS-Synthese beruhen (siehe Tab. 16).

LATS-Bioassay

Dem LATS-Bioassay liegt das Prinzip der in vivo Hormonfreisetzung durch TSH oder Basedow-Antikörpern zugrunde. Adams zeigte 1956 an Meerschweinchen, denen 125J vorgespritzt wurde, einen Anstieg der Radioaktivität im Blut der Versuchstiere nach Injektion von TSH bzw. Seren von Patienten mit M. Basedow (3). Dieser war bedingt durch die Sekretion von 125J-T4 bzw. -T3. Die Zufuhr von Antikörpern führte dabei zu einer verzögerten und prolongierten Wirkung auf das Schilddrüsengewebe verglichen mit TSH, weshalb der Serumfaktor "Long Acting Thyroid Stimulator" (= LATS) genannt wurde. Durch diese unterschiedliche Dynamik war die Differenzierung zwischen TSH- und LATS-Wirkung möglich.

Methoden	Sensitivität	Spezifität
----------	--------------	------------

1. Bindung an TSH-Rezeptoren der Schilddrüsenmembran		
- Verdrängung von ¹²⁵ I-TSH: TBII, Smith 1984, (84)	76 %	85 %
- Blockierung von neutralisierenden Bindungsstellen für LATS: LATS-Protector, Adams 1967 (1)	75 %	o.A.
2. Aktivierung der Adenylatzyklase: TACS, McKenzie 1976, (63)	80 %	80 %
3. Aktivierung der Kolloidendozytose: Onaya 1973 (51)	84 %	o.A.
4. Freisetzung von Schilddrüsenhormonen		
- in vivo: LATS, McKenzie 1958, (62)	40 %	80 %
- in vitro: TSAb, Laurberg 1975, (55)	90 %	100 %
5. Stimulation des Schilddrüsenwachstums: TGI, Drexhage 1980, (27)	75 %	100 %

Tab. 16: Methoden zum Nachweis von Autoantikörpern im Serum von Patienten mit M. Basedow und deren mittlere Sensitivität und Spezifität (o.A.: ohne Angabe in der Literatur).

Der große Nachteil dieser Methode liegt in dem hohen Aufwand für die Tierhaltung begründet. McKenzie (62) benötigte sechs Mäuse pro Testserum. Außerdem fällt auf, daß nur in ca. 40 % aller Patienten mit M. Basedow der Nachweis von LATS gelingt. In einer vergleichenden Untersuchung konnte McKenzie zeigen, daß die Immunglobuline von 11, nicht selektierten Patienten nur in 3 Fällen die Hormonfreisetzung in Mäuseschilddrüsen stimulieren konnten, während sie die Adenylatzyklase in menschlichem Schilddrüsengewebe in 100 % aktivierten. Dies verdeutlicht, daß das Ergebnis des LATS-Bioassays als heterologes System maßgeblich von der Kreuzreaktion des menschlichen Antikörpers mit dem Antigen der Maus abhängt.

LATS-Protector-Assay

Adams beobachtete 1967, daß LATS durch menschliche Schilddrüsenpräparationen gebunden und seine Wirkung im Mäuse-Bioassay neutralisiert wird. Bindende Immunglobuline eines weiteren, LATS-negativen Patientenserums können diese Inaktivierung verhindern, was zu dem Begriff des "LATS-Protectors" führte (1). Mit dieser Methode konnten in 14/20 LATS-negativen Patientenserum Antikörper nachgewiesen werden (2).

Der LATS-Protector-Assay ist allerdings gekennzeichnet durch eine geringe Praktikabilität. Neben den hohen Aufwendungen für den LATS-Assay (siehe oben) ist zusätzlich noch die Schilddrüsenmembranpräparation mittels Ultrazentrifugation erforderlich. Da nach Untersuchungen von Endo (29) eine signifikante Korrelation von LATS-Protector und TBII im

Radiorezeptorassay besteht, sowie die Sensitivität in beiden Systemen vergleichbar ist, erscheint der Aufwand für die LATS-Protector-Bestimmung im klinischen Einsatz als zu hoch.

Radiorezeptorassay

Der Radiorezeptorassay erfaßt, wie der LATS-Protector-Assay, die bindenden Immunglobuline im Serum von Patienten mit M. Basedow. Er beruht auf dem Prinzip der ^{125}J -TSH-Verdrängung vom Rezeptor (TDA = "Thyrotropin Displacement Activity", (69)) bzw. der Blockierung der Bindungsstelle für radioaktiv markiertes TSH (TBII = "Thyrotropin Binding Inhibitory Immunoglobulins", (84)).

Der Radiorezeptorassay fand durch seine einfache Handhabung weite Verbreitung. Allerdings ist der Nachweis stimulieren-der Aktivität mit diesem System nicht möglich. Um dies zu erreichen, mußten weitere Assays entwickelt werden, die im folgenden dargestellt werden. Eine eingehende Darstellung der methodischen Probleme des Radiorezeptorassays findet sich unter 4.4.

Adenylatzyklase-Assay

Gemäß der "second messenger"-Theorie von Sutherland (91) führen Proteohormone nach spezifischer Bindung an der Zelloberfläche über eine Konformationsänderung des Rezeptorproteins zur Stimulation der membrangebundenen Adenylatzyklase, einem Enzym, das die Umwandlung von ATP in cAMP katalysiert. In Übereinstimmung mit diesem Konzept fanden

sich erhöhte intrazelluläre cAMP-Spiegel bei Stimulation des Thyreozyten mit TSH (73). Kaneko zeigte darüberhinaus, daß auch LATS zur Aktivierung der Adenylatzyklase führt (49).

cAMP vermittelt im Thyreozyten eine Vielzahl von intrazellulären Hormonwirkungen. So steigert es den Glucosestoffwechsel (57), aktiviert die RNA-Polymerase (4), fördert die Kolloidbildung (78), erhöht die ^{131}I -Aufnahme (51) und führt zur Freisetzung von Schilddrüsenhormonen (95). Letztere Untersuchung von Tonoue et al. rechtfertigt die Annahme, daß Immunglobuline, die in der Lage sind, die Adenylatzyklase zu aktivieren, für eine Hyperthyreose verantwortlich sein können. Ein direkter Nachweis ist allerdings auch im cAMP-Assay nicht möglich. Die Vielzahl von Einflußmöglichkeiten auf den intrazellulären Stoffwechsel erklärt auch den Nachweis von TACS in bis zu 29 % bei euthyreoten Strumen und 17 % bei fokalen Autonomien (9,14,30). Die Sensitivität dieses Assays bei Patienten mit M. Basedow wurde mit 60 - 100 % angegeben (63,71). Eine Korrelation zwischen TACS-Aktivität und den peripheren Spiegeln von T3 bzw. T4 wurde, mit Ausnahme von Bech et al. (T3, $p < 0,05$, (9)), bisher nicht gefunden (71,94,103).

T3-Bioassay

Um den direkten Nachweis einer Schilddrüsenhormonerhöhung unter dem Einfluß von Autoantikörpern zu erbringen, mußte ein System entwickelt werden, daß die direkte Wirkung der TSAbs auf die Schilddrüsenhormonfreisetzung erfaßt. Laurberg

publizierte 1975 erstmals eine Methode, die die T3-Freisetzung aus Schweineschilddrüsen bestimmt (55). Aufgrund der 16-stündigen Inkubationszeit und der damit verbundenen Autolyseprobleme konnte sich dieser Assay nicht durchsetzen. Eine zweite Möglichkeit wurde 1981 von Atkinson/Kendall-Taylor aufgezeigt (5). Dieses System wurde als Grundlage für diese Arbeit verwendet und weiterentwickelt.

4.2. Methodische Probleme des Bioassays

Im Gegensatz zu Bindungsstudien oder zur Stimulation der membrangebundenen Adenylatzyklase sind für ein Modell, das auf der T3-Freisetzung als spezifische Zelleistung beruht, Thyreozyten mit intakter biologischer Funktion im physiologischen Zellverband erforderlich. So zeigen intakte Schilddrüsenfollikel signifikant höhere cAMP-Spiegel und T3-Sekretion unter TSH-Stimulation (33) als "Inside-out"-Follikel nach Herzog (37). Deshalb wurden im Bioassay Gewebeschnitten verwendet.

Der Nachteil bei der Verwendung von Gewebeschnitten liegt in der fehlenden Möglichkeit der Konservierung. Deshalb muß für jeden Ansatz frisches Gewebe verwendet werden. Dies ist auch die Ursache für die relativ hohe Interassayvarianz von 33 %. Dieses Problem wird auch von Takata (92) beschrieben, der erhebliche Differenzen der absoluten T3-Freisetzung in 2 Schilddrüsenpräparationen fand. Bech gibt in ihrem cAMP-Assay bei Verwendung eines Schilddrüsenhomogenats eine Interassayvarianz von 26 % an (7). Außerdem wurden von Bidey et al. deutliche Unterschiede des cAMP-Anstiegs in verschiedenen Schilddrüsen bei Stimulation mit bTSH be-

schrieben (13). Um eine Variabilität der biologischen Funktion in den einzelnen Präparationen und deren möglichen Einfluß auf die TSAb-Bestimmung zu erkennen, wurden von uns in jedem Ansatz TSH-Standards im Bereich von 0,1 - 10 U/l sowie eine TSAb-Positivkontrolle mitgeführt. Nur Versuche, in denen die T3-Freisetzung durch die Positivkontrolle und dem TSH-Standard mit 1,0 U/l den 2s-Bereich überschritt, wurden gewertet. Dadurch konnten zugleich falsch negative Resultate aufgrund eingeschränkter Stimulierbarkeit des Gewebes vermieden werden. Die wiederholte Testung von 60 Seren im Schweinesystem bzw. 26 Seren unter Verwendung von Humangewebe ergab eine Konkordanz der Ergebnisse in 87 % bzw. 90 %. Nur im Grenzbereich war die Bestimmung unsicher.

Die optimale Größe der Schilddrüsenquader ist abhängig von einer ausreichenden Substratversorgung in vitro. Während einige Autoren (90,105) im cAMP-Assay mit Makroschnitten von ca. 20 mg und einer Dicke von 1 - 2 mm arbeiteten, zeigte sich im Bioassay, daß mit Zunahme des Quaderdurchmessers die basale T3-Freisetzung stark ansteigt und die Stimulierbarkeit des Gewebes mit TSH verlorengeht. Dies ist eine Bestätigung der Ergebnisse von Laurberg (55). Die mit Schilddrüsenquader verschiedener Größe erzielten Daten zeigen, daß eine möglichst große Oberfläche bei geringem Gewebavolumen anzustreben ist. Um die Reproduzierbarkeit der Schnitten zu gewährleisten, wurde die Dicke auf 0,5 mm und die Kantenlänge auf 1,0 mm festgelegt. Das Feuchtgewicht der einzelnen Schilddrüsenquader lag im Mittel bei 565 µg mit einem Variationskoeffizienten von 11 %. Der mittlere DNS-Gehalt betrug 1,70 µg/mg Feuchtgewicht (Variationskoeffizient 7,5 %). Dies liegt im Bereich der von Begg gefundenen DNS-Konzentration nach der Schmidt-Thannhauser-Methode

(1,92 ug/mg; (11)). Hiermit kann die Reproduzierbarkeit der Schilddrüsenquader als gewährleistet betrachtet werden.

Neben der Größe der Schilddrüsenquader ist allerdings auch deren biologische Funktion von Bedeutung. So fanden Rentsch et al. (76) in multinodulären Strumen signifikante Unterschiede in der basalen und mit TSH stimulierten cAMP-Produktion bei Verwendung von Gewebe aus verschiedenen Arealen. Wie diese Arbeitsgruppe fanden auch wir dagegen zwischen verschiedenen Arealen der Schweineschilddrüsen keine funktionelle Heterogenität. Auch im Operationsmaterial einer Struma diffusa ergab sich kein Hinweis für Unterschiede in der Stimulierbarkeit. Zusätzlich wurden die Quader aus einem möglichst kleinen Areal gewonnen. Außerdem wurden die 10 Schnitten pro Serumprobe wahllos aus der Gesamtheit der Gewebeschnitten entnommen, die wiederum während des Waschvorganges entsprechend dem Zufallsprinzip gemischt wurden.

Im Schilddrüsenfollikel wird sowohl T4 als auch T3, an Thyreoglobulin gebunden, gespeichert (20). Diese werden simultan entsprechend ihres intrathyreoidalen Verhältnisses von ca. 20:1 sezerniert. In vivo Untersuchungen von Uller et al. (96) zeigten, daß es bei exogener Stimulation von gesunden Probanden mit TRH i.v. zu einem steilen Anstieg von endogenem TSH kommt, gefolgt von einer Erhöhung der peripheren Schilddrüsenhormone. Dabei ist der maximale T3-Anstieg um den Faktor 2 größer als die maximale T4-Freisetzung. Dieser Effekt der Verschiebung der T3/T4-Relation konnte auch von Valenta (97) durch die Bestimmung der Schilddrüsenhormonkonzentrationen in der Vena thyreoidea nach Stimulation mit TRH bestätigt werden. Dabei fand er einen deutlichen T3-Anstieg bei nur leichter T4-Erhöhung.

Den direkten Nachweis der intrathyreoidalen Konversion konnte Ishii (45) durch in vitro Untersuchungen erbringen. Er beobachtete dabei eine signifikant erhöhte Konversion im Basedow-Gewebe verglichen mit normalem Schilddrüsengewebe. Die Korrelation von Autoantikörperaktivität und T3/T4-Quotienten weist daraufhin, daß sowohl TSH als auch TSAb die intrathyreoidale 5'-Monodejodinase-Aktivität stimulieren. Diese Ergebnisse wurden auch von Atkinson und Kendall-Taylor (5) bestätigt, die bei der in vitro Stimulation von Schweinegewebe eine simultane T3- und T4-Ausschüttung beobachteten, wobei allerdings die Bestimmung des fT3 zu einer besseren Diskriminierung führte. Da die Messung des fT4 keine weitere Zusatzinformation erbrachte, erfolgte die Auswertung der Experimente im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich durch die fT3-Bestimmung.

Das fT3 wurde nach dem Prinzip der Gleichgewichtsdialyse nach Ekins und Ellis (28) ermittelt. Dabei wird mit Hilfe einer Cellulosemembran das freie Hormon vom proteingebundenen Anteil in einem Zweikompartmentensystem abgetrennt. Übereinstimmend zu Ekins fanden auch wir einen hochsignifikanten Zusammenhang ($r = 0,79$; $p < 0,001$, lineare Regression) zwischen fT3 und Gesamt-T3 im Serum. Auch in Hinblick auf die absoluten fT3-Konzentrationen konnten die Daten von Ekins bestätigt werden (Tab. 17). Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Angaben von Atkinson und Kendall-Taylor (5), die beim Vergleich des fT3 in euthyreoten und hyperthyreoten Patientenserum keinen signifikanten Unterschied fanden. Möglicherweise konnten sie mit ihrem Radioimmunoassay in diesem Bereich nicht mehr mit ausreichender Präzision messen. Eine Vernachlässigung des frei dialysierbaren T3-Anteils im Serum kann bei hyperthyreoten Patienten zu falsch positiven Ergebnissen im Bioassay führen. Deshalb

muß das Serum-fT3 vom Gesamt-fT3 subtrahiert werden, um die spezifische fT3-Freisetzung aus dem Gewebe zu ermitteln.

ng/l	fT3 (Ekins, (28))	fT3 (eigene Daten)
Hypothyreose	0 - 3,0	0 - 2
Euthyreose	3,5 - 6,5	3 - 7
Hyperthyreose	7,0 - 40,0	8 - 40

Tab. 17: Vergleich der eigenen Daten bzgl. fT3-Konzentrationen, bestimmt durch Gleichgewichtsdialyse bei hypo-, eu- und hyperthyreoter Stoffwechsellage mit Untersuchungen von Ekins und Ellis (28).

Bei der Bestimmung von freiem T3 ist zu berücksichtigen, daß Trijodthyronin im Serum zu 99,7 % in proteingebundener Form vorliegt (72). Untersuchungen mit Tracersubstanzen zeigten, daß T3 analog zu T4 an TBG, Albumin, und TBPA im Verhältnis 9:1,5:1 gebunden wird (25). Um den Anteil des freien Hormons zu erhöhen, wurden verschiedene Möglichkeiten der Eiweißdenaturierung bzw. Verdrängung aus der Proteinbindung untersucht. In Übereinstimmung mit Hüfner (41) und Sterling (87) zeigte sich kein Einfluß von Diphenylhydantoin auf die T3-Bindung. Auch durch Proteindenaturierung mit absolutem Äthanol konnte der fT3-Anteil nicht vergrößert werden. Dagegen führte das Erhitzen des Serums auf 56°C zu einer Steigerung des freien Hormonanteils um

40 %. Dies beruht auf der thermischen Inaktivierung des TBG (87). Die identische T3-Recovery in Gesamtserum und physiologischer BSA-Lösung bestätigt das Ergebnis von Davis (72), daß die freie Bindungskapazität von Albumin ausreicht, um den fT3-Anstieg bei TBG-Inaktivierung partiell auszugleichen. Neben TBG werden bei Erhitzen des Serums auf Temperaturen über 56°C auch zytotoxische Faktoren, wie z.B. das Komplementsystem, inaktiviert.

Im Gegensatz zu Albumin zeigte sich keine T3-Bindung an γ -Globuline. Zum Nachweis von Basedow-Autoantikörpern werden deshalb von vielen Arbeitsgruppen Immunglobulinpräparationen, die mit Hilfe von Ammoniumsulfat (8,13,24,75,84,104) oder Chromatographie über DEAE-Sephrose (29,40,94) gewonnen werden, verwendet. Die Isolierung von IgG führt allerdings zu einer erhöhten Interassayvarianz (7).

Bei Verwendung von nativem Serum wurde ein unspezifischer Hemmfaktor gefunden, der die Bildung von cAMP in der 5000g-Fraktion blockiert (8,36). Hierbei handelt es sich um einen niedermolekularen Bestandteil, der durch Dialyse über Cellulosemembranen entfernt werden kann (36). In Übereinstimmung mit Atkinson (5) und Laurberg (55) fand sich im Bioassay keine Hemmung der T3-Freisetzung bei Verwendung von Patientenserum. Bei Versuchsdurchführung mit aus Patientenserum isoliertem IgG war die absolute fT3-Konzentration im Unterstand ca. zweifach höher, verglichen mit Gesamtserum als Inkubationsmedium. Die Erklärung dafür beruht auf der fehlenden Bindung von T3 an Serumbestandteile, wie durch Diffusionsexperimente mit 125J-T3 gezeigt werden konnte. Als Ursache für diese unterschiedlichen Beobachtungen muß primär ein in vitro Effekt bei isolierten Schilddrüsenmembranen bzw. Subfraktionen diskutiert werden. Ein möglicher

Einfluß der parallel zur Inkubation mit Gewebe durchgeführten Dialyse des Serums über Cellulosemembranen im hier verwendeten Zweikompartmentensystem kann nicht ausgeschlossen werden. Allerdings muß nach Hensen (36) die Serumdialyse über 48 Stunden durchgeführt werden, um den Hemmfaktor zu eliminieren.

Normales IgG hemmt zu 80 % die Bindung von TSH an Schilddrüsenmembranen in vitro in einer Konzentration von 1 g/l (80). Darüberhinaus blockiert es vollständig die cAMP-Produktion in Membranpräparationen (40) bzw. Schilddrüsen-schnitten (12) in Konzentrationen von 7 g/l. Im Bioassay zeigten sich beim Vergleich der Dosisabhängigkeiten von bTSH, das in IgG-freiem Earles-Puffer bzw. Normalserum-pool (IgG-Konzentration 13 g/l) gelöst wurde, keine Unterschiede der relativen Stimulation des Schilddrüsen-gewebes. Die mit Earles-Puffer erzielte 2,5-fach höhere fT3-Konzentration im Unterstand muß analog zu oben auf die fehlende Serumbindung zurückgeführt werden (siehe 3.1.5.). Während Experimente mit subzellulären Partikeln nicht unbedingt auf in vivo Verhältnisse übertragbar sind, muß bei Verwendung von Gewebeschnitten ein unspezifischer in vitro Effekt als unwahrscheinlich erachtet werden. Der entscheidende methodische Unterschied zwischen dem cAMP-System (12) und dem Bioassay ist die kurze Inkubationszeit von 20 Minuten. Möglicherweise kann normales IgG durch sterische Blockierung der TSH-Rezeptoren die TSH-Wirkung verzögern. So fand Bidey (13) im cAMP-Assay unter Verwendung von menschlichen Schilddrüsen-schnitten während der 2. Inkubationsstunde einen deutlichen Anstieg von cAMP bei Verwendung von 5 U/l bTSH in IgG-Lösung, während bei in Puffer gelöstem bTSH die Stimulationskurve nach einer maximalen Steilheit zwischen der 30. und 60. Minute bereits in ihren asymptotischen Bereich

übergang. Bidey (12) konnte außerdem zeigen, daß bei Ersatz des IgG-haltigen Mediums durch Puffer die blockierende Wirkung auf die TSH-Stimulation sofort und vollständig reversibel ist. Dies steht im Gegensatz zu Beobachtungen mit TSA_b (54) und schließt damit eine spezifische IgG-Rezeptor-Interaktion aus. Die sofortige Normalisierung der TSH-Wirkung, unabhängig von der Dauer der IgG-Vorinkubation, kann durch eine Bindung von TSH an IgG bedingt sein (12). Unter diesem Gesichtspunkt kann die verzögerte TSH-Wirkung durch die verlängerte Diffusionszeit des IgG-TSH-Komplexes in das Gewebe erklärt werden.

Ein weiterer möglicher Störfaktor für den Bioassay stellt das im Patientenserum gelöste Methimazol dar. Pharmakokinetische Studien ergaben eine maximale Serumkonzentration von 150 ng/ml bei oraler Gabe von 10 mg (47) bzw. 650 ng/ml bei 30 mg Methimazol (23). Die Halbwertszeit liegt im Mittel bei ca. 5 Stunden (47). Im Bioassay zeigte sich im Bereich von 60 ng/ml bis 500 ng/ml keine signifikante Reduktion der basalen bzw. mit TSH oder TSA_b stimulierten T₃-Freisetzung. Bei der Diskussion dieses fehlenden Einflusses bei pharmakologischen Konzentrationen im Testserum in vitro muß die freie Diffusion von Methimazol (MG = 600), das nicht an Serumproteine gebunden wird (48), über die Cellulosemembran in das untere Kompartiment berücksichtigt werden. Methimazol hemmt die Jodisation und Koppelung der jodierten Tyrosinderivate. Demgegenüber konnte Onaya (70) zeigen, daß bei Stimulation von humanem Schilddrüsengewebe in vitro mit TSH bzw. TSA_b innerhalb von 5 Minuten die Aktivierung der Kolloidendozytose erfolgt. Diese Möglichkeit der Hormonfreisetzung ist durch Methimazol nicht blockierbar.

Die spezifische Wirkung von bTSH konnte durch eine dosisabhängige T3-Freisetzung im Bioassay gezeigt werden. Die untere Nachweisgrenze für bTSH lag im Schweinegewebe bei 0,1 U/l und im menschlichen Struma-Gewebe bei 0,3 U/l. Die maximale Stimulation wurde bei 1 - 5 U/l bTSH gefunden. Sowohl in Hinblick auf die untere Nachweisgrenze als auch bezüglich der Dosisabhängigkeit der TSH-Wirkung ist das hier beschriebene System vergleichbar mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen unter Anwendung von Bioassay (5,92) oder cAMP-Assay (30,94). Eine glockenförmige Dosis-Wirkungskurve mit abnehmender T3- bzw. cAMP-Freisetzung bei supramaximalen TSH-Konzentrationen wurden auch von Bech (8) und Bidey (13) beschrieben. Möglicherweise führen hohe Konzentrationen von TSH zu einer gegenseitigen, sterischen Behinderung der einzelnen Moleküle an der Rezeptorbindungsstelle (93).

Bei Verwendung von Patientenserum muß der Einfluß von endogenem hTSH auf die T3-Freisetzung im Bioassay und damit als mögliche Ursache für falsch positive Ergebnisse diskutiert werden. Die untere Nachweisgrenze für bTSH liegt bei 0,3 U/l im Human-Assay bzw. 0,1 U/l im Schweinebioassay. Bei Patienten mit hyperthyreoter Stoffwechsellaage ist die endogene TSH-Konzentration $< 0,8$ mU/l, da es durch den negativen Feedback-Mechanismus der erhöhten peripheren Schilddrüsenhormone supprimiert wird. Unter Normalisierung der Hormonsituation allerdings können TSH-Spiegel bis zu 10 mU/l auftreten, die im Falle einer iatrogen induzierten Hypothyreose noch weiter ansteigen können. Aus diesen Zahlen wird deutlich, daß die Serumkonzentration von hTSH üblicherweise mindestens um den Faktor 10 bis 30 unter der Nachweisgrenze von bTSH liegt. Da biologisch ähnlich aktive Präparationen von hTSH immer noch nicht verfügbar sind (99), wurde der

Einfluß von hTSH durch 6 Seren von hypothyreoten Patienten mit Z.n. Thyreoidektomie wegen Struma maligna vor Radiojodtherapie (TSH-Konzentration 32 - 48 mU/l) untersucht. Keines dieser Seren war in der Lage, die T3-Freisetzung über den 2s-Bereich der Negativkontrollen zu stimulieren. Dies ist in Einklang mit Arbeiten von Rapoport (74) und Clark (22), die im Radiorezeptorassay keinen Unterschied im Bindungsverhalten von hTSH und bTSH und damit speziesspezifischen Effekt fanden. Somit kann ein Einfluß des endogenen Serum-TSH auf den Bioassay vernachlässigt werden.

Die Sensitivität des Bioassays gegenüber TSA_b kann auf der Basis der Inzidenz bei unbehandelten Patienten mit M. Basedow mit den Daten anderer Autoren verglichen werden (siehe Tab. 18). Die Inzidenz von 91 % im hier beschriebenen Bioassay entspricht den Ergebnissen von Atkinson (5) und Takata (92). Der Vergleich mit cAMP-Systemen unterstreicht, daß die T3-Freisetzung in vitro ein geeigneter Parameter zum Nachweis von Autoantikörpern bei M. Basedow ist.

Der Normalbereich der T3-Freisetzung aus Schilddrüsengewebe bei Inkubation mit Patientenseren wurde in dieser Arbeit durch die doppelte Standardabweichung der Negativkontrollen festgelegt. Daraus ergibt sich, daß entsprechend den mathematischen Gesetzen unter der Annahme einer Normalverteilung in 5 % der Kontrollen ein falsch positives Ergebnis zu erwarten ist. Unter der Berücksichtigung der Anzahl der Kontrollen ($n = 50$) kann deshalb die Spezifität von 94 % bei Verwendung von Humangewebe und 92 % im Schweine-System als vergleichbar mit dem theoretisch zu erwartenden Ergebnis gewertet werden. Im Gegensatz dazu fand Atkinson (5) bei gesunden Kontrollpersonen ($n = 22$) eine Spezifität von 100 %, die scheinbar auf eine bessere Diskriminierung von

T3-Freisetzung:

Atkinson 1981 (5)	44/49	90 %
Takata 1980 (92)	25/28	89 %
eigene Ergebnisse	21/23	91 %
im Mittel	90/100	90 %

cAMP-Bildung:

Bech 1979 (9)	47/57	83 %
Bidey 1983 (14)	28/28	100 %
Etienne-Decerf 1981 (30)	55/69	80 %
Hensen 1984 (36)	24/42	57 %
Orgiazzi 1976 (71)	9/15	60 %
Toccafondi 1980 (94)	14/15	93 %
im Mittel	177/226	78 %

Tab. 18: Inzidenz von Autoantikörpern bei Patienten mit aktivem M. Basedow vor Therapie bestimmt durch verschiedene Arbeitsgruppen im T3-Bioassay bzw. cAMP-Assay.

hyperthyreoten Basedow-Patienten und euthyreoten Personen hinweist. Dabei wurde allerdings das frei dialysierbare T₃, das vom Serumgesamttrijodthyronin abhängt und, wie gezeigt wurde (siehe 3.1.5.), eine Unterscheidung der oben aufgeführten Patienten unabhängig vom TSAb erlaubt, nicht berücksichtigt. Deshalb beruht die Differenzierung der beiden Patientengruppen nicht nur auf der spezifischen fT₃-Freisetzung durch TSAb, sondern wird auch durch die im Serum enthaltenen freien Schilddrüsenhormone beeinflusst und ist daher von einem systematischen Fehler beeinflusst.

Von verschiedenen Autoren (9,30) wird ein vermehrter Nachweis von Autoantikörpern im cAMP-Assay bei Patienten mit Struma diffusa, Struma nodosa und Autonomien beschrieben. Dies konnte in dieser Arbeit in Übereinstimmung mit Vittl et al. (100) nicht bestätigt werden. Bei einem Anteil von 12 % positiven Ergebnissen in der Kontrollgruppe muß bei Etienne-Decerf (30) von falsch positiven TACS-Nachweisen bei reduzierter Assay-Spezifität ausgegangen werden. Bezüglich der Ergebnisse von Bech (9) müssen unterschiedliche Empfindlichkeiten dieses cAMP- und dem Bioassay zum Nachweis von Stimulatoren niedriger Konzentrationen diskutiert werden. Dagegen spricht allerdings, daß beide Systeme in Hinblick auf die untere Nachweisgrenze für bTSH sowie die Antikörperinzidenz bei unbehandelten Patienten mit M. Basedow vergleichbar sind (siehe oben). Möglicherweise erfolgt auch eine unspezifische Reaktion von IgG und Zellmembranbestandteilen in vitro.

4.3. Speziesspezifität

Zur Beantwortung der Frage, ob menschliches Gewebe für eine Methode zum Nachweis von schilddrüsenstimulierenden Immunglobulinen besser geeignet ist als Schweinegewebe, muß die Speziesspezifität dieser Autoantikörper untersucht werden. Hierzu liegen bisher in der Literatur unterschiedliche Daten vor: Rapoport (75) und Zakarija (104) fanden, daß der cAMP-Assay mit menschlichen Thyreozyten sensitiver ist im Vergleich zu Schilddrüsengewebe von Hund, Meerschweinchen, Kalb und LATS-Assay. Die Daten von Davies (24) zeigen dagegen eine gute Übereinstimmung zwischen der TBII-Aktivität in menschlichen und Schweineschilddrüsenmembranen im Gegensatz zu Schafpräparationen. Davies und Humphries (42) fanden sogar eine höhere Sensitivität für die Bestimmung von TBII mit Schweinemembranen. In dem hier beschriebenen Bioassay fanden sich konkordante Ergebnisse von pTSAb und hTSAb in 91 % bei unbehandelten bzw. 80 % bei Remissionspatienten (vgl. 3.6.). Vor thyreostatischer Therapie zeigte sich darüberhinaus eine hochsignifikante Korrelation zwischen den beiden Systemen ($p < 0,01$). Es zeigte sich, daß Patientenseren mit hoher TSAb-Aktivität im menschlichen Gewebe immer Schweinegewebe stimulieren konnten, was sich mit der Beobachtung von Zakarija (104) im cAMP-Assay deckt. Ähnliche Ergebnisse werden auch von Davies (24) und Strakosch (88) beschrieben, die darauf hinweisen, daß die Antikörperaktivität die Assayergebnisse stärker beeinflusst, als die Speziesspezifität der verwendeten Rezeptoren. Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß Schweineschilddrüsen-gewebe anstelle von menschlichem Struma diffusa-Gewebe im Bioassay alternativ verwendet werden kann, falls dieses nicht verfügbar ist.

4.4. Methodische Probleme des Radiorezeptorassays

Der Radiorezeptorassay stellt in der Endokrinologie ein allgemein verbreitetes System zum Nachweis von Hormonen dar. 1974 wurde dieses Prinzip erstmals zum Nachweis von Autoantikörpern bei M. Basedow angewandt (84). Bedingt durch den relativ beschränkten technischen Aufwand wurde dieses System von vielen Arbeitsgruppen übernommen (15,29, 32,67,89). 1982 wurde erstmals ein Radiorezeptorassay auf der Basis von solubilisierten TSH-Rezeptoren aus Schweine-schilddrüsen als kommerzieller Kit (TRAK-Assay, Henning Berlin) verfügbar. Die TBII-Bestimmungen im Rahmen dieser Arbeit wurden mit diesem Assay durchgeführt. Der Vorteil der solubilisierten Rezeptoren besteht in der Möglichkeit, direkt Serum anstelle von isoliertem IgG verwenden zu können. Shewring konnte eine signifikante Korrelation der TBII-Aktivität von Gesamtserum und daraus isoliertem IgG zeigen (83). Es fand sich außerdem keine unspezifische Beeinflussung durch physiologische IgG-Konzentrationen.

Die Präzision eines Assays wird durch Intra- und Interassay-varianz bestimmt. Der Intraassay-Variationskoeffizient lag mit 1 - 6 % vergleichbar mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (15,81,83). Dagegen war der Interassay-Variationskoeffizient mit 22 bis 26 % über den in der Literatur beschriebenen Werten von 4 % (26) bis 16 % (18). In Übereinstimmung mit der Originalpublikation von Shewring (83) war die Streuung im Grenzbereich am größten, was zu einer Reduktion der Spezifität führte (siehe unten). Die Verwertbarkeit der vom Hersteller mitgelieferten "Positivkontrolle" zur Präzisionsbestimmung ist allerdings erheblich eingeschränkt, da sie mit 400 U/l bTSH außerhalb des Meßbereiches des Assays liegt und nur Hinweise bezüglich der

unspezifischen Bindung liefert. Die "Negativkontrolle" kann ebenfalls als Assaykontrolle nicht verwertet werden, da diese Lösung die Grundlage für die Assayauswertung darstellt und die Bindungsfähigkeit der Rezeptoren für das 125J-TSH widerspiegelt. Ein Variationskoeffizient von 20 % für die Bindungsfähigkeit der Rezeptoren und 26 % für die Negativkontrolle zeigt deshalb, daß es nicht möglich war, Rezeptorpräparationen und TSH-Markierungen konstanter Qualität zu erreichen. Es konnte gezeigt werden, daß diese chargenabhängigen Veränderungen im Bindungsverhalten der TSH-Rezeptoren durch die Einführung eines TSH-Standards zu erfassen sind und dadurch der Interassay-Variationskoeffizient deutlich reduziert werden kann. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vor kurzem die Standardisierung des Kits mit einer TSH-Verdünnungsreihe eingeführt.

Die Sensitivität des Radiorezeptorassays für bTSH lag bei 120 uU und war damit in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Shewring (100 uU, (83)). Dies schließt einen Einfluß von hTSH im Patientenserum auf den TRAK-Assay aus, da die physiologischen Konzentrationen erheblich unter der Nachweisgrenze liegen (siehe auch 3.5.1.). Außerdem konnte gezeigt werden, daß die Affinität von hTSH im Vergleich zu bTSH in Bezug auf die TSH-Rezeptorbindung bei Verwendung von Schweineschilddrüsen um den Faktor 10 niedriger liegt (99).

Entscheidend für die Verwendung des Radiorezeptorassays zum Nachweis von Basedow-Antikörper ist die Sensitivität des Systems bezüglich TBII. Hiervon ist auch die Inzidenz der Autoantikörper bei Patienten mit unbehandeltem M. Basedow abhängig. Tab. 19 gibt einen Überblick über diesbezügliche Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen.

Im Rahmen dieser Arbeit ergab sich eine Inzidenz von 83 % bei $n = 23$ und entspricht damit der Angabe von Shewring (83). Zusammen mit dem hochsignifikanten Unterschied der TBII-Aktivität von Basedow-Seren im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigt sich, daß der TRAK-Assay ein sensitives System zum Nachweis von Rezeptorantikörpern bei M. Basedow ist.

	Patientenzahl	Inzidenz
Bliddal 1981 (15)	116	66 %
Endo 1978 (29)	27	60 %
Hensen 1984 (36)	42	71 %
Mukhtar 1975 (67)	56	100 %
Shewring 1982 (83)	11	83 %
Smith 1974 (84)	25	88 %
Strakosch 1978 (89)	15	93 %
im Mittel	292	76 %

Tab. 19: Inzidenz von TBII im Radiorezeptorassay verschiedener Arbeitsgruppen bei Patienten mit aktivem, unbehandeltem M. Basedow.

Die Überprüfung der Spezifität des TRAK-Assays ergab in 13 - 16 % positive Ergebnisse bei Patienten ohne Schilddrüsenerkrankungen bzw. mit gesicherter Autonomie und bei z.n. Thyreoidektomie wegen Struma maligna. Dies steht im Gegensatz zu Angaben in der Literatur, wobei keine Antikörper im Radiorezeptorassay bei schilddrüsengesunden Personen (15,83,84,89) bzw. Patienten mit autonomen Schilddrüsenarealen (17,82) beschrieben wurden. Diese Ergebnisse widersprechen auch Daten von Becker (10) und Schifferdecker (81), die eine Spezifität von 100 % bzw. 95 % mit diesem Testbesteck fanden. Dagegen zeigten sich bei der Prüfung des Kits durch die Arbeitsgruppe Pickardt, München, positive TBII-Werte in einem allgemein-endokrinologischen Kontrollkollektiv (persönliche Mitteilung). Eine Analyse der Daten dieser Arbeit ergab eine Streubreite der Spezifität von 68 bis 95 % in Abhängigkeit der gelieferten Charge. Parallel dazu wurde ein Wechsel von grenzwertigen Kontrollseren in ihrer Beurteilung beobachtet. Ähnliches wurde auch von Schifferdecker, Frankfurt, beobachtet (persönliche Mitteilung) und muß als Ausdruck der hohen Interassayvarianz im Grenzbereich gewertet werden. Dies bestätigte sich nach Einführung der Standardisierung des Assays mit einer TSH-Verdünnungsreihe, die zu einer deutlichen Verbesserung der Spezifität führte (39).

Bei Patienten mit Struma diffusa fanden sich in 22 % F-Indices >15 %. Die Inzidenz in diesem Kollektiv war damit im Vergleich zu den restlichen Kontrollgruppen am höchsten. Neben den oben diskutierten Ursachen muß hierbei berücksichtigt werden, daß auch von anderen Arbeitsgruppen positive Ergebnisse von bis zu 42 % im Radiorezeptorassay bei Strumapatienten gefunden wurden (15,17). Medeiros-Neto (65)

beschrieb kürzlich bei Strumaträgern in einem endemischen Jodmangelgebiet in 33 % TBII, die sich nach Jodgabe normalisierten. Möglicherweise wird der Radiorezeptorassay durch Immunglobuline, die das Wachstum der Schilddrüse stimulieren (86) und ebenfalls TSH-Rezeptorantikörper darstellen (98), beeinflusst.

4.5. Klinische Wertigkeit

Die klinische Wertigkeit des im Rahmen dieser Arbeit aufgebauten Bioassays wurde im Vergleich zu einem Radiorezeptorassay an Patienten mit aktivem M. Basedow vor Therapie, unter Thyreostatika und in Remission untersucht. Dabei ist zu berücksichtigen, daß beide Methoden nur semiquantitativ verwendbar sind, bedingt durch die noch eingeschränkte Interassayvarianz.

Es zeigte sich, daß sowohl der Bioassay als auch der TRAK-Assay zum Nachweis von Autoantikörpern im Rahmen dieser Erkrankung geeignet sind. TSAb konnte dabei im Serum von Patienten mit unbehandeltem M. Basedow häufiger im Vergleich zu TBII (91 % vs. 83 %) nachgewiesen werden. Das Ergebnis ist allerdings aufgrund der kleinen Fallzahl statistisch nicht signifikant. Zusammen mit der niedrigeren Nachweisgrenze für bTSH kann dies ein Hinweis auf eine Überlegenheit des Bioassays bezüglich der Sensitivität sein. Allerdings konnte auch TSAb nicht im Serum von jedem Patienten mit aktiver Erkrankung nachgewiesen werden. Dies beruht möglicherweise auf der peripheren Verdünnung der intrathyreoidalen Antikörperkonzentrationen. So konnte Kendall-Taylor bei paralleler, intraoperativer Punktion in

Schilddrüsenvenen 10-fach höhere TSAb-Spiegel im Vergleich zu peripheren Venen feststellen (50).

Bei der Diskussion der unterschiedlichen Inzidenz von TSAb und TBII ist aber auch zu berücksichtigen, daß Bioassay und Radiorezeptorassay nicht in jedem Fall durch identische Antikörperkonzentrationen beeinflußt wurden. So zeigte sich keine Korrelation zwischen TBII- und TSAb-Aktivität.

Dieser Befund steht im Einklang mit Untersuchungen von McKenzie (64), Sugenoja (90) und Hardisty (34), die keinen Zusammenhang zwischen TBII und TACS bzw. TSAb fanden. In der Gruppe thyreostatisch behandelter Patienten stieg der Anteil diskordanter Beurteilungen von Radiorezeptor- und Bioassay auf 50 % (TBII/pTSAb) bzw. 75 % (TBII/hTSAb), ein Ergebnis, das auch von Kuzuya (53) gefunden wurde. Bliddal (16) beschreibt ebenfalls eine Dissoziation von TBII und TACS unter Therapie. Hensen (36) sieht die Ursache für eine fehlende Korrelation von TBII- und TACS-Aktivität in der hohen Interassayvariation. Allerdings stützt sich diese Beobachtung auf den Langzeitverlauf von nur 2 Patienten.

Bemerkenswert war das Ergebnis von zwei unbehandelten Patienten, in deren Seren hohe pTSAb- und hTSAb-Indices nachgewiesen wurden bei fehlender TBII-Aktivität. Diese Befunde wurden durch Untersuchungen von Valente (98) mit monoklonalen Antikörpern bestätigt. Er zeigte, daß Lymphozyten von Patienten mit M. Basedow auch Immunglobuline produzieren, die ohne nachweisbare TSH-Verdrängung die membrangebundene Adenylatzyklase aktivieren.

Aus früheren Untersuchungen (61,71) waren aber auch Antikörper bekannt, die TSH vom Rezeptor verdrängten, aber keine Aktivierung der Adenylatzyklase zeigten. Die Existenz dieser blockierenden Immunglobuline konnte ebenfalls durch Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern bestätigt werden (98). Mit diesen Beobachtungen kann der Nachweis von TBII bei Patienten, die sich ohne Anhalt für eine hyperthyreote Stoffwechsellage klinisch in Remission befanden, erklärt werden.

Bei drei euthyreoten Patienten in klinischer Remission konnten neben TBII auch TSAb nachgewiesen werden. Die Persistenz der Augensymptomatik bei 2 dieser Patienten weist daraufhin, daß der primäre Autoimmunprozeß, eventuell unter Verlagerung der klinischen Symptomatik, persistiert. Möglicherweise liegt hierbei ein Gleichgewicht zwischen stimulierenden und blockierenden Antikörpern des TSH-Rezeptors vor. Eine weitere Erklärung besteht in der in vivo Inaktivierung der TSAb durch anti-idiotypische Antikörper (46), die in vitro, eventuell durch das Vorerhitzen des Serums, nicht nachvollzogen werden kann. So konnte van der Heide (35) das Auftreten von Immunkomplexen bei Patienten in Remission nachweisen. Nach Spaltung dieser Makromoleküle zeigten Bruchstücke im Radiorezeptorassay TSH-verdrängende Aktivität.

Zusammenfassend unterstützen obige Ergebnisse die Auffassung, daß beim M. Basedow heterogene Antikörperpopulationen mit bindender und/oder stimulierender Aktivität, die gegen Bestandteile der Thyreozytenmembran, eventuell den TSH-Rezeptor oder dessen Substrukturen selbst, gerichtet sind, vorkommen. Im aktivem Stadium der Erkrankung treten TBII

und TSAb meist koinzident auf. Sie werden aber durch thyreostatische Therapie, zumindest in einigen Fällen, unterschiedlich beeinflusst.

Die mittlere TSAb- bzw. TBII-Aktivität fiel, ausgehend von einem hohen Niveau bei aktiver, unbehandelter Erkrankung, unter thyreostatischer Behandlung ab und war in der Remissionsgruppe nicht mehr signifikant von den Kontrollpersonen zu unterscheiden. Dies kann als Hinweis für einen Zusammenhang zwischen mittlerer Antikörperaktivität und Erkrankungsstadium gewertet werden. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Bidey (14) mit dem cAMP-Assay beschrieben.

Zwischen der Höhe der TSAb- bzw. TBII-Aktivität und dem Titer von mikrosomalen bzw. Thyreoglobulin-Antikörpern oder dem Auftreten einer endokrinen Orbitopathie wurde kein Zusammenhang gefunden. Dies ist eine Bestätigung der Befunde von Fenzi (31) und Bech (9) mit dem cAMP-Assay.

In Übereinstimmung mit Hardisty (34) fand sich eine hochsignifikante Beziehung zwischen TSAb-Aktivität und den peripheren Schilddrüsenhormonen. Dies weist nachdrücklich auf die klinische Wertigkeit des Bioassays hin. Im Radiorezeptorassay konnte diese Beobachtung nicht bestätigt werden, möglicherweise da dieses System von stimulierenden und blockierenden Immunglobulinen beeinflusst wird. Mit Ausnahme von Bech (9) wurde auch im cAMP-Assay keine Korrelation zu den Schilddrüsenhormonen beobachtet. Als Erklärung sind Untersuchungen von Igarashi (44) anzuführen, der bei Stimulation von Schilddrüsenfollikeln mit TSH einen Anstieg von Diacylglycerol beobachtete. Diacylglycerol bewirkt eine Stimulation der Proteinkinase C, die als Katalysator auf

intrazelluläre Stoffwechselvorgänge wirkt (78). Hiermit wird deutlich, daß auch cAMP unabhängige Transmittersysteme bei der Stimulation des Schilddrüsengewebes von Bedeutung sind. Dies unterstreicht den Vorteil eines Systems wie dem hier beschriebenen Bioassay, durch den die biologisch relevante Wirkung von Autoantikörpern in Form der T3-Freisetzung erfaßt wird.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß Radiorezeptorassay und Bioassay zum Nachweis von Autoantikörpern bei Patienten mit M. Basedow geeignet sind. Allerdings werden auch erhebliche Differenzen zwischen beiden Systemen, speziell bei Patienten unter thyreostatischer Therapie, beobachtet. Darüberhinaus fand sich nur zwischen TSAb und dem peripheren Schilddrüsenhormon eine positive Korrelation. Inwieweit diese Unterschiede zwischen TSAb- und TBII-Aktivitäten sowie den Nachweismethoden für den Einzelfall als Verlaufs- und prognostischer Parameter von Bedeutung sind, muß anhand von prospektiven Studien geprüft werden. Diese Verlaufsuntersuchungen sind weiteren Arbeiten vorbehalten.

5. Zusammenfassung

Es wurde ein Bioassay zum Nachweis von Autoantikörpern im Serum von Patienten mit M. Basedow entwickelt. Dieser beruht auf der in vitro T3-Freisetzung aus Quadern von intraoperativ gewonnenem, menschlichem Struma diffusa-Gewebe oder Schweineschilddrüsen. Das fT3 wurde mit einem hochempfindlichen Radioimmunoassay bestimmt. Die Optimierung des Bioassays erfolgte durch Variation von Gewebepräparation, Quadergröße und -anzahl, Inkubations- und Diffusionsbedingungen. Unspezifische Einflüsse von Methimazol und hTSH im Patientenserum auf den Bioassay konnten ausgeschlossen werden. Der Vergleich der stimulierenden Wirkung von Basedow-Seren und -IgG zeigt, daß eine Isolierung des IgGs für dieses System nicht nötig ist.

Der Bioassay zeigte eine dosisabhängige Stimulierbarkeit durch bTSH und schilddrüsenstimulierende Antikörper (TSAb). Die untere Nachweisgrenze für bTSH lag im Bereich von 0,1 U/l, die maximale Reaktion bei 1-5 U/l. Die T3-Freisetzung durch Patientenseren mit M. Basedow vor Therapie unterschied sich hochsignifikant ($p < 0,001$) von der durch die Kontrollgruppe. Die mittlere TSAb-Aktivität fiel bei den Patienten unter thyreostatischer Therapie ab und war in der Remissionsgruppe nicht mehr von der des Normalkollektives different.

hTSAb und pTSAb-Aktivität zeigten bei Patienten mit aktivem M. Basedow vor Therapie eine hochsignifikante Korrelation ($p < 0,01$). Dies läßt den Schluß zu, daß Schweineschilddrüsen für Routineuntersuchungen alternativ zu humanem Gewebe verwendet werden können.

Die klinische Wertigkeit des Bioassays wurde im Vergleich zu einem kommerziellen Radiorezeptorassay untersucht, der auf der Blockierung der spezifischen TSH-Bindung durch Basedow-Antikörper beruht (TBII). Beim Vergleich von TSAb und TBII fand sich bei beiden Assays ein positiver Antikörpernachweis bei ca. 90 % der Patienten vor Therapie mit einem Anteil von konkordanten Befunden in 80 %. Es zeigte sich aber kein signifikanter Zusammenhang zwischen TSAb- und TBII-Aktivität ($r = -0,20$; $p > 0,10$). Unter thyreostatischer Therapie stieg der Anteil diskordanter Befunde auf 50 % an. Bei Patienten in Remission fanden sich zwischen beiden Systemen wieder 80 % konkordante Ergebnisse.

Im Gegensatz zu den TBII-Indices fand sich eine hochsignifikante Korrelation ($p < 0,01$) zwischen TSAb-Aktivität und peripheren Schilddrüsenhormonen bei Patienten mit aktivem, unbehandeltem M. Basedow. Dies weist darauf hin, daß durch den Bioassay die biologisch relevante Wirkung der Basedow-Autoantikörper erfaßt wird.

6. Literaturverzeichnis

1. Adams D.D., Kennedy T.H.:
Occurrence in thyrotoxicosis of a g-globulin which protects LATS from neutralization by an extract of thyroid gland.
J Clin Endocrinol 27:173, 1967.
2. Adams D.D., Kennedy T.H.:
Evidence to suggest that LATS-Protector stimulates the human thyroid gland.
J Clin Endocrinol 33:47, 1971.
3. Adams D.D., Purves H.D.:
Abnormal responses in the assay of thyrotropin.
Univ Otago Med School Proc. 34:11, 1956.
4. Adiga P.R., Murthy P.V.N., McKenzie J.M.:
Stimulation by thyrotropin, long-acting thyroid stimulator, and dibutyryl 3',5'-adenosine monophosphate of protein and ribonucleic acid synthesis and ribonucleic acid polymerase activities in porcine thyroid in vitro.
Biochemistry 10:702, 1971.
5. Atkinson S., Kendall-Taylor P.:
The stimulation of thyroid hormone secretion in vitro by thyroid stimulating antibodies.
J Clin Endocrinol Metab 53:1263, 1981.
6. Basedow C.A.:
Exophthalmus durch Hyperthrophie des Zellgewebes in der Augenhöhle
Wschr ges Heilk 6:197, 1840.
7. Bech K., Feldt-Rasmussen U., Madsen S.M.:
Influence of thyroglobulin on basal and stimulated human thyroid adenylate cyclase activity.
J Clin Endocrinol Metab 53:264, 1981.
8. Bech K., Madsen S.N.:
Human thyroid adenylate cyclase in non-toxic goitre: Sensitivity to TSH, flouride and thyroid stimulating immunoglobulins.
Clin Endocrinol 8:457, 1978.

9. Bech K., Madsen S.N.:
Thyroid adenylate cyclase stimulating immunoglobulins in thyroid diseases.
Clin Endocrinol 11:47, 1979.
10. Becker W., Reiners C., Börner W.:
Bestimmung schilddrüsenstimulierender Autoantikörper mit einem Radiorezeptorassay (TRAK-Assay).
NUC compact 14:168, 1983.
11. Begg D.J., McGirr E.M., Munro H.N.:
Protein and nucleic acid content of the thyroid glands of different mammals.
Endocrinology 76:171, 1965.
12. Bidey S.P., Marshall N.J., Ekins R.P.:
Inhibition by normal immunoglobulin G of thyrotropin-stimulated production of cyclic AMP in slices of normal human thyroid.
J Endocrinol 87:271, 1980.
13. Bidey S.P., Marshall N.J., Ekins R.P.:
Adenylate cyclase activity and the accumulation and release of adenosine 3',5'-monophosphate in normal human thyroid tissue slice preparations: Responses to thyrotropin and thyroid stimulating antibodies.
J Clin Endocrinol Metab 53:246, 1981.
14. Bidey S.P., Marshall N.J., Ekins R.P.:
Bioassay of thyroid-stimulating immunoglobulins using human thyroid cell cultures: optimization and clinical assessment.
Clin Endocrinol 18:193, 1983.
15. Bliddal H.:
A stable, reproducible radioreceptorassay for thyrotropin binding inhibiting immunoglobulins (TBII).
Scand J Clin Lab Invest 41:441, 1981.

16. Bliddal H., Bech K., Petersen P.H., Siersbaek-Nielsen K., Friis T.:
Evidence of a correlation between thyrotropin receptor binding inhibition and thyroid adenylate cyclase activation by immunoglobulins in Graves' disease before and during long term antithyroid treatment.
Acta Endocrinol 101:35, 1982.
17. Brown R.S., Jackson I.M.D., Pohl S.L., Reichlin S.:
Do thyroid stimulating immunoglobulins cause non-toxic and toxic multinodular goitre?
Lancet I:904, 1978.
18. de Bruin T.W.A., Krol M.C., van der Heide D.:
Standardization of the radioreceptorassay against antithyrotropin receptor antibodies in Graves' disease.
Acta Endocrinol 100:245, 1982.
19. Burton K.:
Determination of DNA-concentration with diphenylamin in: *Methods in Enzymology*, Vol. XII, Nucleic Acids, Part B, Grossman L., Moldave K. (eds.), New York 1968.
20. Chopra I.J., Fisher D.A., Solomon D.H., Beall G.W.:
Thyroxine and triiodothyronine in the human thyroid.
J Clin Endocrinol Metab 36:311, 1973.
21. Clague R., Mukhtar E.D., Pyle G.A., Nutt J., Clark F., Scott M., Evered D., Smith B.R., Hall R.:
Thyroid stimulating immunoglobulins and the control of thyroid function.
J Clin Endocrinol Metab 43:550, 1976.
22. Clark O.H., Gerend L.P., Goretzki P., Nissenenson R.A.:
Characterization of the thyrotropin receptor-adenylate cyclase system in neoplastic human thyroid tissue.
J Clin Endocrinol Metab 57:140, 1983.

23. Cooper D.S., Bode H.H., Nath B., Saxe V., Maloof F., Ridgway E.C.:
Methimazole pharmacology in man: studies using a new developed radioimmunoassay for methimazole.
J Clin Endocrinol Metab 58:473, 1984.
24. Davies T.F.:
Autoantibodies to the human thyrotropin receptor are not species specific.
J Clin Endocrinol Metab 52:426, 1981.
25. Davis P.J., Handwerger B.S., Gregerman R.I.:
Thyroid hormone binding by human serum prealbumin (TB)
J Clin Invest 51:515, 1972.
26. Docter R., Bos G., Visser T.J., Hennemann G.:
Thyrotropin binding inhibiting immunoglobulins in Graves' disease before, during and after antithyroid therapy, and its relation to long-acting thyroid stimulator.
Clin Endocrinol 12:143, 1980.
27. Drexhage H.A., Bottazzo G.F., Doniach D., Bitensky L., Chayen J.:
Evidence for thyroid-growth-stimulating immunoglobulins in some goitrous thyroid diseases.
Lancet I:287, 1980.
28. Ekins R.P., Ellis S.M.:
The radioimmunoassay of free thyroid hormones in serum.
in: Thyroid Research, Robbins J., Braverman L.E. (eds.), Amsterdam 1975.
29. Endo K., Kasagi K., Konishi J., Ikekubo K., Tatsuyo O., Takeda Y., Mori T., Torizuka K.:
Detection and properties of TSH-binding inhibitor immunoglobulins in patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis.
J Clin Endocrinol Metab 46:734, 1978.
30. Etienne-Decerf J., Winand R.J.:
A sensitive technique for determination of thyroid-stimulating immunoglobulins in unfractionated serum.
Clin Endocrinol 14:83, 1981.

31. Fenzi G.F., Macchia E., Monzani F., Bartalena L., Antonelli A.:
Thyroid stimulating antibodies recognize different binding sites on thyroid plasma membranes.
Ann Endocrinol 43:69A, 1983.
32. Garcia A. Hunter A.N., Wilkins J.A., von Westarp C.:
Thyrotropin binding inhibiting assay: comparison of crude and purified membrane preparations.
Acta Endocrinol 101:199, 1982.
33. Greil W., Gärtner R.; Stübner D., Permanetter W., Horn K.:
Preparation of isolated pig thyroid follicles with normal polarity and function.
Acta Endocrinol 105 (Suppl. 264):49, 1984.
34. Hardisty C.A., Kendall-Taylor P., Atkinson S., Humphries H., Munro D.S.:
The assay of Graves' immunoglobulins: A comparison of different methods.
Clin Endocrinol 18:637, 1983.
35. van der Heide D., Daha M.R., Bolk J.H., Bussemaker J.K., deBruin T.W.A., Goslings B.M., van Es L.A.:
Circulating immune complexes and thyroid stimulating immunoglobulins before, during and after antithyroid drug therapy in patients with Graves' disease.
Lancet I:1376, 1980.
36. Hensen J., Kotulla P., Finke R., Bogner U., Badenhoop K., Meinhold H., Schleusener H.:
Methodological aspects and clinical results of an assay for thyroid stimulating antibodies - correlation with thyrotropin binding inhibiting antibodies.
J Clin Endocrinol Metab. 58:980, 1984.
37. Herzog V., Miller F.:
Structural and functional polarity of inside-out follicles prepared from pig thyroid gland.
Europ J Cell Biol 24:74, 1981.

38. Hjeltn H.:
Protein A from staphylococcus aureus: purification, structural studies and applications of its interaction with immunoglobulin G.
Acta Universitatis Upsaliensis 213:Thesis, 1974.
39. Hörmann R., Saller B., Müller R., Hobelsberger A., Moser E., Mann K.:
Methodische Probleme und klinische Wertigkeit der Bestimmung von TSH-Rezeptor-Antikörper mit einem kommerziellen Kit.
Lab med 9:208, 1985
40. Holmes S.D., Dirmikis S.M., Martin T.J., Munro D.S.:
Effects of thyroid-stimulating hormone and immunoglobulins on adenylate cyclase activity and the accumulation of cyclic AMP in human thyroid membranes and slices.
J Endocrinol 79:121, 1978.
41. Hufner M., Hesch R.D.:
A comparison of different compounds for TBG-blocking used in radioimmunoassay for triiodothyronine.
Clin Chim Acta 44:101, 1973.
42. Humphries H., Hardisty C.A., Dirmikis S.M., Munro D.S.:
Comparison of radioreceptorassay using porcine or human thyroid membranes and McKenzie bioassay for bovine thyrotropin and thyroid stimulating immunoglobulins.
VI. International Congress of Endocrinology, Melbourne, Australia, 1980 (Abstract 315).
43. Hunter W.M.:
Radioimmunoassay.
in: Handbook of experimental immunology, 2nd edition, Weir D.M. (ed.), Oxford 1973.
44. Igarashi Y., Kondo Y.:
Acute effects of thyrotropin on phosphatidylinositol degradation and transient accumulation of diacylglycerol in isolated thyroid follicles.
Biochem Biophys Res Commun 97:759, 1980.

45. Ishii H., Inada M., Tanaka K., Mashio Y., Naito K., Nishihawa M., Imura H.:
Triiodothyronine generation from thyroxine in human thyroid: enhanced conversion in Graves' thyroid tissue.
J Clin Endocrinol Metab 52:1211, 1981.
46. Islam M.N., Pepper B.M., Briones-Urbina R., Farid N.R.:
Biological activity of anti-thyrotropin anti-idiotypic antibody.
Eur J Immunol 13:57, 1983.
47. Jansson R., Dahlberg P.A., Lindström B.:
Comparative bioavailability of carbimazole and methimazole.
Intern J Clin Pharm Ther Tox 21:505, 1983.
48. Johannsen K., Nyboe Anderson A., Kampmann J.P., Molholm-Hansen J., Mortensen H.B.:
Excretion of methimazole in human milk.
Eur J Clin Pharmacol 23:339, 1982.
49. Kaneko T., Zor U., Field J.B.:
Stimulation of thyroid adenyl cyclase activity and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate by long-acting thyroid stimulator.
Metabolism 19:430, 1970.
50. Kendall-Taylor P., Knox A.J., Steel N.R., Atkinson S.:
Evidence that thyroid-stimulating antibody is produced in the thyroid gland.
Lancet I:654, 1984.
51. Knopp J., Stolz V., Tong W.:
Evidence for the induction of iodide transport in bovine thyroid cells treated with thyroid-stimulating hormone or dibutyryl cyclic adenosine 3',5'-monophosphate.
J Biol Chem 245:4403, 1970.

52. Kriss J.P., Pleshakov V., Cien J.R.:
Isolation and identification of the long acting
thyroid stimulator and its relation to hyperthyroi-
dism and circumscribed pretibial myxoedema.
J Clin Endocrinol Metab 24:1005, 1964.
53. Kuzuya N., Chin S.C., Ikeda H., Uchimura H.,
Ito K., Nagataki S.:
Correlation between thyroid stimulators and 3,5,
3'-Triiodothyronine suppressibility in patients du-
ring treatment for hyperthyroidism with thionamide
drugs: comparison of assays by thyroid stimulating
and thyrotropin displacing activity.
J Clin Endocrinol Metab 48:706, 1979.
54. Kuzuya N., Uchimura H., Ikeda H., Chin S.C.,
Hamada N., Ito K., Nagataki S.:
Adenosine 3',5'-monophosphate concentrations and
responsiveness to thyrotropin and thyroid stimula-
ting immunoglobulins in normal and Graves' tissue.
J Clin Endocrinol Metab 51:59, 1980.
55. Laurberg P., Weeke J.:
T3 release from thyroid slices as an assay for
thyroid stimulators.
Scand J Clin Lab Invest 35:723, 1975.
56. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.:
Protein-measurement with the Folin phenol reagent.
J Biol Chem 193:265, 1951.
57. Macchia V., Meldolesi M.F., Maselli P.:
Effect of cyclic 3',5'-AMP on glucose metabolism
in thyroid homogenates.
Endocrinology 85:895, 1969.
58. Manley S.W., Bourke J.R., Hawker A.W.:
The thyrotropin receptor in guinea pig thyroid
homogenate: generous properties.
J Endocrinol 61:419, 1974.
59. Mann K., Göring W., Lipp W., Keipert B., Karl H.J.,
Geiger R., Fink E.:
Radioimmunoassay of human urinary kallikrein.
J Clin Chem Clin Biochem 18:395, 1980.

60. Marchant B., Lees J., Alexander W.D.:
Antithyroid drugs.
Pharmac Ther Bull 3:305, 1978.
61. Matsuura N., Yamada Y., Nohara J., Konishi K.,
Kasagi K., Endo K., Kojima H., Wataya K. :
Familial neonatal transient hypothyroidism due
to maternal TSH-binding inhibitor immunoglobulins.
N Engl J Med 303:302, 1980.
62. McKenzie J.M.:
Delayed thyroid response to serum from thyrotoxic
patients.
Endocrinology 62:865, 1958.
63. McKenzie J.M.:, Zakarija M.:
A reconsideration of a thyroid-stimulating immuno-
globulin as the cause of hyperthyroidism in Graves'
disease.
J Clin Endocrinol Metab. 42:778, 1976.
64. McKenzie J.M., Zakarija M., Sato A.:
Humoral immunity in Graves' disease.
in: Clinics in Endocrinology and Metabolism,
Vol.7/Nr. 1, Robert Volpe (ed.). London 1978.
65. Medeiros-Neto G., Knobel M., Cavaliere H., Lima N.:
TSH receptor antibodies in large multinodular
untreated goiter: effect of iodized oil prophylaxis.
VII. International Congress of Endocrinology 1984,
Quebec, Canada (Abstract 1649).
66. Mehdi S.Q., Nussey S.S.:
A radio-ligand receptor assay for the long acting
thyroid stimulator: inhibition by long acting thy-
roid stimulating hormone to human thyroid membranes.
Biochem J 145:105, 1975.
67. Mukhtar E.D., Smith B.R., Pyle G.A., Hall R.,
Vice P.:
Relation of thyroid-stimulating immunoglobulins
to thyroid function and effects of surgery, radio-
iodine, and antithyroid drugs.
Lancet I:713, 1975.

68. Nishizuka Y., Takai Y., Kishimoto A., Kikkawa U., Kaibuchi K.:
Phospholipid turnover in hormone action.
Rec Progr Horm Res 40:301, 1984.
69. O'Donnell J., Trokoudes K., Silverberg J., Row V., Volpe R.:
Thyrotropin displacement activity of serum immunoglobulins from patients with Graves' disease.
J Clin Endocrinol Metab 46:770, 1978.
70. Onaya T., Kotani M., Yamada T., Ochi Y.:
New in vitro tests to detect the thyroid stimulator in sera from hyperthyroid patients by measuring colloid droplet formation and cyclic AMP in human thyroid slices.
J Clin Endocrinol Metab 36:859, 1973.
71. Orgiazzi J., Williams D.E., Chopra I.J., Solomon D.H.:
Human thyroid adenyl cyclase-stimulating activity in immunoglobulin G of patients with Graves' disease.
J Clin Endocrinol Metab 42:341, 1976.
72. Osathanondh R., Tulchinsky D., Chopra I.J.:
Total and free thyroxine and trifodothyronine in normal and complicated pregnancy.
J Clin Endocrinol Metab 42:98, 1976.
73. Pastan J., Katzun R.:
Activation of adenyl cyclase in thyroid homogenates by thyroid stimulating hormone.
Biochem Biophys Res Commun 29:792, 1967.
74. Rapoport B., Filetti S., Takai N., Seto P., Halverson G.:
Studies on the cAMP response to thyroid stimulating immunoglobulin (TSI) and thyrotropin (TSH) in human thyroid cell monolayers.
Metabolism 31:1159, 1982.
75. Rapoport B., Takai N.A., Filetti S.:
Evidence for species specificity in the interaction between TSH and thyroid stimulating immunoglobulins and their receptor in thyroid tissue.
J Clin Endocrinol Metab 54:1059, 1982.

76. Rentsch H., Studer H., Frauchinger B., Siebenhüner L.:
Topographical heterogeneity of basal and thyrotropin-stimulated adenosine 3',5'-monophosphate in human nodular goiter.
J Clin Endocrinol Metab 53:514, 1981.
77. Rodbard D.:
Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassays and immunoradiometric assays.
Clin Chem 20:1255, 1974.
78. Rodesch F., Neve P., Willems C., Dumont J.E.:
Stimulation of thyroid metabolism by thyrotropin, cyclic 3',5'-AMP, dibutyryl cyclic 3',5'-AMP and prostaglandin E1.
Eur J Biochem 8:26, 1969.
79. Sachs, L.:
Angewandte Statistik.
4. Auflage, Berlin 1974.
80. Sato A., Zakarija M., McKenzie J.M.:
The influence of normal human immunoglobulin G and of thyroid stimulating antibody on the binding of thyrotropin to thyroid plasma membranes.
Endocr Res Comm 5:259, 1978.
81. Schifferdecker E.; Schulz F., Schöffling K.:
Erste Erfahrungen mit einem neuen Testbesteck zur Bestimmung von Antikörpern gegen den TSH-Rezeptor.
Akt Endokr Stoffw 4:170, 1983.
82. Schleusener H., Joseph K., Mahlstedt J., Kotulla P., Bogner U., Wenzel B., Meinhold H.:
Differences between immunogenic toxic diffuse goiter (Graves' disease) and goiter with disseminated autonomy: preliminary results.
J Mol Med 4:129, 1980.
83. Shewring G., Smith B.R.:
An improved radioreceptor assay for TSH receptor antibodies.
Clin Endocrinol 17:409, 1982.

84. Smith B.R., Hall R.:
Thyroid-stimulating immunoglobulins in Graves' disease.
Lancet II:427, 1974
85. Smith B.R., Pyle G.A., Petersen V.B., Hall R.:
Interaction of thyroid-stimulating antibodies with the human thyrotropin receptor.
J Endocrinol 75:401, 1977.
86. Smyth P.P.A., Neylan D., O'Donovan D.K.:
The prevalence of thyroid-stimulating antibodies in goitrous disease assessed by cytochemical section bioassay.
J Clin Endocrinol Metab 54:357, 1982.
87. Sterlin K., Milch P.O.:
Thermal inactivation of thyroxine-binding globulin for direct radioimmunoassay of triiodothyronine in serum.
J Clin Endocrinol Metab 38:866, 1974.
88. Strakosch C.R., Joyner D., Manley S.W.W., Wall J.R.:
The species specificity of TSH receptor binding antibodies as measured by radioreceptorassay.
Clin Endocrinol 17:173, 1982.
89. Strakosch C.R., Joyner D., Wall J.R.:
Thyroid stimulating antibodies in patients with autoimmune disorders.
J Clin Endocrinol Metab 47:361, 1978.
90. Sugenoya A., Kidd A., v. Row V., Volpe R.:
Correlation between thyrotropin-displacing activity and human thyroid stimulating activity by immunoglobulins from patients with Graves' disease and other thyroid disorders.
J Clin Endocrinol Metab 48:398, 1979.
91. Sutherland E.W., Oye I., Butcher R.W.:
The action of epinephrine and the role of the adenyl cyclase system in hormone action.
Rec Progr Horm Res 21:623, 1965.

92. Takata I., Suzuki Y., Saïdo K., Sato T.:
Human thyroid stimulating activity and clinical state in antithyroid treatment of juvenile Graves' disease.
Acta Endocrinol 94:46, 1980.
93. Tate R.L., Schwartz H.I., Holmes J.M., Kohn L.D., Winand R.J.:
Thyrotropin receptors in thyroid plasma membranes.
J Biol Chem 250:6509, 1975.
94. Toccafondi R.S., Aterini S., Medici M.A., Rotella C.M., Tanini A., Zonefrati R.:
Thyroid-stimulating antibodies detected in sera of Graves' patients using human thyroid cell cultures.
Clin Exp Immunol 40:532, 1980.
95. Tonoue T., Tong W., Stolc V.:
TSH and dibutyryl-cyclic-AMP stimulation of hormone release from rat thyroid glands in vitro.
Endocrinology 86:271, 1970.
96. Uller R.P., van Herle A.J., Chopra I.J.:
Comparison of alterations in circulating thyroglobulin, triiodothyronine and thyroxine in response to exogenous (bovine) and endogenous (human) thyrotropin.
J Clin Endocrinol Metab 37:741, 1973.
97. Valenta L., Eisenberg H., Meyes D.M.:
Concentrations of thyroid hormones in thyroidal vein following TRH.
Program of the 62nd Annual Meeting of the Endocrine Society, Washington 1980.
98. Valente W.A., Vitti P., Yavin Z., Yavin E., Rotella C.M., Grollmann E.F., Toccafondi R.S., Kohn L.D.:
Monoclonal antibodies to the thyrotropin receptor: stimulating and blocking antibodies derived from the lymphocytes of patients with Graves' disease.
Proc Natl Acad Sci 79:6680, 1982.

99. Verrier B., Planells R., Lissitzky S.:
Thyrotropin binding to and adenylate cyclase activity of porcine thyroid plasma membranes.
Eur J Biochem 74:243, 1977.
100. Vitti P., Rotella C.M., Valente W.A., Cohen J., Aloj S.M., Laccetti P., Ambesi-Impiombato F.S., Grollman E.F., Pinchera A., Toccafondi R., Kohn L.D.:
Characterization of the optimal stimulatory effects of Graves' monoclonal and serum immunoglobulin G on adenosine 3',5'-monophosphate production in FRTL-5 thyroid cells: a potential clinical assay.
J Clin Endocrinol Metab 57:782, 1983.
101. Werner S.C.:
Modification of the classification of the eye changes of Graves' disease: recommendations of the ad hoc committee of the American Thyroid Association.
J Clin Endocrinol Metab 44:203, 1977.
102. Wissenschaftliche Tabellen
Ciba-Geigy
7. Auflage, 1977.
103. Yabu Y., Amino N., Mori H., Miyai K., Tanizawa O., Takai S.J., Kumahara Y., Matsuzuka F., Kuma K.:
Postpartum recurrence of hyperthyroidism and changes of thyroid stimulating immunoglobulins in Graves' disease.
J Clin Endocrinol Metab 51:1454, 1980.
104. Zakarija M., McKenzie J.M.:
Zoological specificity of human thyroid stimulating immunoglobulins.
J Clin Endocrinol Metab 47:249, 1978.
105. Zakarija M., McKenzie J.M., Banovac K.:
Clinical significance of assay of thyroid stimulating antibodies in Graves' disease.
Ann Int Med 93:28, 1980.

7. Anhang

7.1. Geräte

Gewebemesser	Fa. Thomas, USA
Skalpell	Fa. Feather, Japan
Pinzetten	Fa. Inox, Deutschland
Dialysiermembran	Nadir NG, Fa. Kalle, Deutschland
Wasserbad	Fa. Braun-Melsungen, Deutschland
Wärmeblock	Fa. Liebisch, Deutschland
Mikrotom	Fa. Mitutoyo, Japan
Teflontöpfchen	Spezialanfertigung, Laborwerk-
-ringe	stätten Klinikum Großhadern
Analysenwaage	Typ 2494, Fa. Sartorius, Deutschland
Spektralphotometer	DMR 10, Fa. Zeiss, Deutschland
Ultraschallhomo-	Sonifier B12, Branson Sonic Power
genisator	Company, USA

7.2. Substanzen

Hepes	Fa. Serva, Deutschland
Cefotaxim	Fa. Höchst, Deutschland
DNS-Standard	Fa. Sigma Chemicals (D 4522), USA
IgG-Standard	Fa. Sigma Chemicals (I 5506), USA
Diphenylhydantoin	Fa. Parke-Davis, USA
Methimazol	Fa. Degussa Pharma Gruppe
	Asta-Werke, Deutschland
Protein A-Sepharose	Fa. Pharmacia Chemicals, Schweden
CL4B	
Biogel P 100	Fa. Biorad, USA
Insulin	Actrapid, Fa. Novo, Deutschland
bTSH	Dr. Pierce, USA, (biologische
	Aktivität 30 U/mg).
übrige Substanzen	Fa. Merck, Deutschland

7.3. Lösungen

Puffer nach Earles:

13,60 g NaCl	+ 2,0 g Gelatine
+ 0,80 g KCl	+ 2,0 g Glucose
+ 0,53 g $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	+ 9,53 g Hepes
+ 0,40 g MgSO_4	+ 0,1 g Cefotaxim
+ 0,25 g NaH_2PO_4	+ 100 U Insulin
+ 0,60 g NaHCO_3	
ad 1000 ml mit Aqua dest.	
pH 7,4 mit NaOH eingestellt	

Diphenylamin-Reagenz:

1,5 g Diphenylamin in 100 ml Eisessig
+ 1,5 ml konz. Schwefelsäure
+ 0,5 ml wässrigen Acetaldehyd 1,6 %

Phosphatpuffer 0,1 M:

13,6 g/l KH_2PO_4 (Lösung A)
89,0 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Lösung B)
Lösung A mit Lösung B titrieren, bis ein pH = 7,0
erreicht ist

Phenolreagenz nach Lowry:

Reagenz A: 100 g Na_2CO_3 in 1 l 0,5 NaOH
Reagenz B: 1 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ in 100 ml Aqua dest.
Reagenz C: 2 g Kaliumtartrat in 100 ml Aqua dest.
Reaktionslösung: 15 ml Reagenz A
+ 0,75 ml Reagenz B
+ 0,75 ml Reagenz C

Folin-Phenol-Reagenz: 10 ml in 100 ml Aqua dest.

RIA-Puffer (1 %):

0,2 g KH_2PO_4
+ 1,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
+ 10,0 g BSA
+ 8,8 g NaCl
+ 0,2 g NaN_3
ad 1000 ml mit Aqua dest.
pH 7,5 mit NaOH einstellen

Essigsäure-Lösung (1 M, pH = 2,8):

57 ml Eisessig
+ 7 g NaCl
ad 1000 ml mit Aqua dest.

TSH-Lösungen:

TSH-Stammlösung:

Das erhaltene TSH wurde in 0,9 % NaCl gelöst (500 U/l).
In 20 μl Portionen wurde es in Eppendorf-Gefäßen bei -80°C
gelagert.

TSH-Verdünnungsreihe:

Zu 1 ml vorerhitztem Normalserum wurden 20 μl TSH-Stammlö-
sung gegeben. Die so entstandene TSH-Lösung mit 10 U/l
wurde mit Normalserum weiterverdünnt.

7.4. Abkürzungen

TSH	Thyreoida-stimulierendes Hormon
TRH	Thyreotropin-Releasing-Hormon
TBII	TSH-bindungsinhibierendes Immunglobulin
TACS	Thyreoidaler Adenylatzyklase-Stimulator
TSAb	Thyreoida-stimulierende Antikörper
LATS	Long-Acting-Thyroid-Stimulator
TGI	Schilddrüsenwachstum-stimulierende Immunglobuline
T3	Trijodthyronin
T4	Thyroxin
fT3	freies Trijodthyronin
HCG	Humanes Choriongonadotropin
TBG	Thyroxin-bindendes Globulin
IgG	Immunglobulin G
BSA	bovines Serumalbumin
PEG	Polyäthylenglykol
RIA	Radioimmunoassay
EIA	Enzymimmunoassay
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Tc	Technetium
J	Jod
MG	Molekulargewicht
$\bar{x}$	Mittelwert
s	Standardabweichung
SEM	mittlere Abweichung der Mittelwerte
h	human
b	bovin
p	Schwein-

7.5. Danksagung

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Priv. Doz. Dr. Klaus Mann an der Medizinischen Klinik II, Klinikum Großhadern, von September 1981 bis Oktober 1985 durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Gustav Paumgartner für die Ermöglichung der experimentellen Arbeit an seiner Klinik.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. Klaus Mann für die hervorragende Betreuung der Arbeit. Sein stetes Interesse hat mir durch zahlreiche Diskussionen und wertvolle Anregungen sehr geholfen. Außerdem waren mir seine Einstellung zum wissenschaftlichen Arbeiten und sein freundliches Wesen ein großes Vorbild.

Herrn Prof. Dr. B. Günther, Chirurgische Klinik, Klinikum Großhadern, Herrn Prof. Dr. F. Spelsberg, Krankenhaus Martha-Maria, und Herrn Chefarzt Dr. O. Wiesend, Krankenhaus München-Nymphenburg, danke ich für die Überlassung von menschlichem Schilddrüsengewebe.

Recht herzlich danke ich Herrn Dr. Rudolf Hörmann, daß er stets ein offenes Ohr für meine Probleme hatte und daß er mir durch seinen Idealismus und seine Hilfsbereitschaft über manche "Durststrecke" hinweghalf.

Danken möchte ich auch Frau Gisela Reichel für ihre engagierte technische Hilfe und Herrn Gerald Spöttl für die Unterstützung bei der IgG-Isolierung und Chromatographie.

Zum Schluß gilt mein Dank der gesamten endokrinologischen Arbeitsgruppe für die freundschaftliche Atmosphäre und die gute Zusammenarbeit.

7.6. Lebenslauf

- geboren: 15. Februar 1959 in München als Sohn von Robert Müller und seiner Ehefrau Theresia, geb. Pregler
- 9/65 - 7/69: Besuch der Grundschule an der Guldeinstraße, München
- 9/69 - 7/78: Besuch des math.-nat. Klenze-Gymnasiums, München.
Abschluß mit Erhalt der Allgemeinen Hochschulreife am 29. Juni 1978
- 11/78-10/84: Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
- 8/80: Ärztliche Vorprüfung
- 8/81: 1. Teil der Ärztlichen Prüfung
- 8/83: 2. Teil der Ärztlichen Prüfung
- 10/84: 3. Teil der Ärztlichen Prüfung
- 06.11.84: Erteilung der Approbation als Arzt durch das Bayerische Staatsministerium des Innern
- seit 12/84: Grundwehrdienst als Sanitätsoffizier am Wehrbereichskommando VI, München.

